



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ Ι: ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ & ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Μεταβολομική (Metabolomics) του Ανθρώπινου Οργανισμού
σε Προσομοιούμενες Συνθήκες Εγκλωβισμού σε Ερείπια
Κτηρίων μετά από Σεισμό**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αναστασία Β. Γεωργιάδου

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2008

στον Βασίλη και την Ευανθία

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανώτατη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα. (Ν. 5343/1932, Άρθρο 202).



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ Ι: ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ & ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μεταβολομική (Metabolomics) του Ανθρώπινου Οργανισμού σε Προσομοιούμενες Συνθήκες Εγκλωβισμού σε Ερείπια Κτηρίων μετά από Σεισμό

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αναστασία Β. Γεωργιάδου

Συμβουλευτική Επιτροπή : Μιλτιάδης Σταθερόπουλος
Νικόλαος Τζαμτζής
Αθηνά Παππά

Εγκρίθηκε από την επταμελή εξεταστική επιτροπή την 26^η Σεπτεμβρίου 2008

.....
Μ. Σταθερόπουλος
Καθηγητής Ε.Μ.Π

.....
Ν. Τζαμτζής
Αναπλ. Καθηγητής Ε.Μ.Π

.....
Α. Παππά
Αναπλ. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π

.....
Δ.Κέκος
Καθηγητής Ε.Μ.Π

.....
Φ. Κολίσης
Καθηγητής Ε.Μ.Π

.....
Χ. Σπηλιοπούλου
Αναπλ.Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής
Ε&Κ Πανεπιστήμιο Αθηνών

.....
Α. Τσαρμπόπουλος
Αναπλ.Καθηγητής Φαρμακευτικής Σχολής
Πανεπιστήμιο Πατρών

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2008

.....
Αναστασία Β. Γεωργιάδου

Χημικός-Διδάκτωρ Ε.Μ.Π., Σχολής Χημικών Μηχανικών

Copyright © Αναστασία Β. Γεωργιάδου, 2008

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	I
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	II
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	V
ABSTRACT.....	VI

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καταστροφικότητα των Σεισμών.....	1
1.2 Επιχειρήσεις Διάσωσης.....	2
1.3 Ανθρώπινος Οργανισμός και Εγκλωβισμός.....	3
1.4 Εκπνεόμενος Αέρας.....	4
1.5 Ούρα.....	5
1.6 Αίμα.....	7
1.7 State of the art-στις Επιχειρήσεις Εντοπισμού και Διάσωσης Εγκλωβισμένων.....	9
1.7.1 Ρομπότ εντοπισμού και διάσωσης.....	9
1.7.2 Ποντίκια ρομπότ (robotat).....	12

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ-ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ

2.1 Εισαγωγή.....	14
2.2 Ιστορική Αναδρομή.....	15
2.2.1 Εκπνεόμενος αέρας.....	16
2.3 Μεταβολομική.....	17
2.3.1 Ιστορική αναδρομή.....	19
2.3.2 Στρατηγικές εφαρμογής μεταβολομικής.....	20
2.3.3 Μεταβολομική &πτητικές οργανικές ενώσεις.....	22

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ

3.1 Εισαγωγή.....	26
3.2 Συλλογή Δειγμάτων Εκπνεόμενου Αέρα.....	26
3.2.1 Μεταλλικά δοχεία.....	26
3.2.2 Σακούλες δειγματοληψίας.....	29
3.3 Προσυγκέντρωση VOCs Αέρα Εκπνοής.....	31
3.3.1 Ψυχρή παγίδευση (κρυογενική).....	31
3.3.2 Χημική παγίδευση.....	32
3.3.3 Παγίδευση με προσρόφηση.....	32
3.4 Τεχνικές Ανάλυσης Εκπνεόμενου Αέρα.....	39
3.4.1 Αέρια χρωματογραφία.....	39
3.4.2 Φασματομετρία μάζας μέσω αντίδρασης μεταφοράς πρωτονίων (PTR-MS).....	40
3.4.3 Φασματομετρία μάζας-σωλήνας ροής επιλεγμένων ιόντων (SIFT-MS).....	41
3.4.4 Χημικοί Αισθητήρες.....	42
3.4.5 Οπτική Απορρόφηση.....	42
3.4.6 Χρωματομετρικές Αναλύσεις.....	43

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΟΥ & ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ

4.1 Καταστάσεις Εγκλωβισμένων από Βιοχημική και Ιατρική Σκοπιά.....	44
4.2 Κατάσταση Α.....	44
4.3 Κατάσταση Β.....	46
4.4 Κατάσταση Γ.....	50
4.5 Συσχέτιση του Χρόνου Επιβίωσης με τις Καταστάσεις των Εγκλωβισμένων.....	51
4.6 Καταστάσεις Εγκλωβισμού και Μεταβολικές Αντιδράσεις.....	53
4.7 Κύκλος Εντοπισμού και Διάσωσης.....	57

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΜΟΝΑΔΑ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΚΡΟΦΗΣΗΣ (TDU)

5.1 Περιγραφή Μονάδας Θερμικής Εκρόφησης για Αναλύσεις Εκπνεόμενου Αέρα.....	58
5.1.1 Αρχική έκδοση μονάδας θερμικής εκρόφησης.....	58
5.1.2 Βελτιωμένη έκδοση μονάδας θερμικής εκρόφησης.....	61
5.2 Πειράματα Υποδομής Μονάδας Θερμικής Εκρόφησης.....	63
5.2.1 Αριστοποίηση συνθηκών λειτουργίας διαφορετικών τμημάτων της μονάδας θερμικής εκρόφησης (TDU) για την ανάλυση εκπνεόμενου αέρα.....	63
5.2.2 Αξιολόγηση χαρακτηριστικών μεθόδου λειτουργίας μονάδας θερμικής εκρόφησης (TDU) για την ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα (Method Validation).....	66
5.3 Πειράματα Υπολογισμού Συντελεστών Απόκρισης για Ποσοτικές Μετρήσεις VOCs Εκπνεόμενου Αέρα.....	73
5.3.1 Προσδιορισμός συντελεστών απόκρισης (RRF).....	73

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. Α΄ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

6.1 Σκοπός.....	75
6.2 Ομάδα Αναφοράς.....	75
6.3 Υλικά-Οργανολογία-Μέθοδος.....	75
6.3.1 Υλικά συλλογής δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα.....	75
6.3.2 Υλικά συλλογής δειγμάτων αίματος και ούρων.....	76
6.3.3 Οργανολογία ανάλυσης δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα.....	76
6.3.4 Οργανολογία ανάλυσης δειγμάτων αίματος και ούρων.....	77
6.3.5 Μέθοδος.....	77
6.4 Παρουσίαση Αποτελεσμάτων.....	79
6.5 Συμπεράσματα-Παρατηρήσεις.....	89

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. Β΄ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

7.1 Σκοπός.....	91
7.2 Ομάδα Εθελοντών με Έντονο Στρες.....	91
7.3 Υλικά-Οργανολογία-Μέθοδος.....	91
7.3.1 Υλικά συλλογής δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα.....	91
7.3.2 Οργανολογία ανάλυσης δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα.....	92
7.3.3 Μέθοδος.....	92
7.4 Παρουσίαση Αποτελεσμάτων.....	93
7.4.1 Κυψελιδική κλίση (Alveolar gradient).....	93
7.4.2 Αποτελέσματα δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα.....	94
7.5 Συμπεράσματα-Παρατηρήσεις.....	96

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. Γ΄ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

8.1 Σκοπός.....	97
8.2 Ομάδες Εθελοντών με Αποχή από Τροφή και Νερό.....	97
8.3 Υλικά-Οργανολογία-Μέθοδος.....	97
8.3.1 Υλικά συλλογής δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα.....	98
8.3.2 Οργανολογία ανάλυση δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα.....	98
8.3.3 Μέθοδος.....	98
8.4 Παρουσίαση Αποτελεσμάτων.....	99
8.5 Συμπεράσματα-Παρατηρήσεις.....	104

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

9.1 Γενικά Συμπεράσματα.....	105
------------------------------	-----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

10.1 Προοπτικές.....	108
----------------------	-----

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας, του Τομέα Χημικών Επιστημών, της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Θεωρώ καθήκον μου να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς τον Καθηγητή Ε.Μ.Π. Μιλτιάδη Κ. Σταθερόπουλο, για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές και την βοήθεια του στην τελική διαμόρφωση της παρούσας διατριβής, όσο και για την επιστημονική στήριξη που μου προσέφερε όλα τα χρόνια της συνεργασίας μας στην επίλυση δύσκολων προβλημάτων που προέκυπταν κατά καιρούς.

Θερμές ευχαριστίες επιθυμώ να εκφράσω στα άλλα δύο μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π Αθηνά Παππά και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ε.Μ.Π Νικόλαο Τζαμτζή για τις συμβουλές τους, τις παρατηρήσεις τους και την συνολική καθοδήγηση στην διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της διατριβής αυτής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω προς τους καθηγητές Ε.Μ.Π, Κολίση Φ. και Κέκο Δ., την αναπληρώτρια καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Ε&Κ Π.Α Σπηλιοπούλου Χ. καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών Τσαρμπόπουλο Α., για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν σαν μέλη, στην εξεταστική επιτροπή της παρούσας διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους τους ανθρώπους με τους οποίους συνεργαστήκαμε και μοιραστήκαμε κοινές ανησυχίες και στόχους τους Διδάκτορες Χημικούς Μηχανικούς, Μικέδη Κ., Σιάνο Ε. και Κάρμα Σ. και ιδιαίτερα τον υποψήφιο Διδάκτορα της Ιατρικής Σχολής Ε&Κ Π.Α. Κολοστούμπη Δ.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια μου για την ηθική στήριξη τους όλο το χρονικό διάστημα, μέχρι την ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σήμερα, η πιθανότητα για την εκδήλωση ενός σεισμού έχει ένα 100% ποσοστό να πραγματοποιηθεί. Παρόλο που εκατομμύρια άνθρωποι μπορεί ποτέ να μην βιώσουν την εμπειρία ενός σεισμού, η συχνότητα εμφάνισης του είναι μεγάλη στον πλανήτη. Έχει εκτιμηθεί πως υπάρχουν 500.000 ανιχνεύσιμοι σεισμοί ετησίως, σε παγκόσμιο επίπεδο, 100.000 από τους οποίους μπορούμε να τους αισθανθούμε ενώ 100 από αυτούς προκαλούν ζημιές. Έτσι σήμερα –κάπου– κάποιος σεισμός θα πραγματοποιηθεί.

Σεισμοί σημειώνονταν πάντοτε. Οι επιπτώσεις τους όμως φαίνονται σήμερα βαρύτερες για δύο λόγους, αφενός επειδή η πυκνότητα του πληθυσμού είναι μεγαλύτερη, ακόμα και σε περιοχές υψηλού κινδύνου και αφετέρου επειδή υπάρχουν νέες βιομηχανικές εγκαταστάσεις οι οποίες σε περίπτωση σεισμού μπορεί να αποδειχθούν ευάλωτες (αγωγοί φυσικού αερίου ή πετρελαίου, φράγματα, ορισμένες χημικές βιομηχανίες κ.α). Να σημειωθεί ότι το ένα τρίτο του πληθυσμού του πλανήτη ζει σε ζώνες υψηλού σεισμικού κινδύνου.

Παρόλο που η περισσότερη έρευνα έχει εστιαστεί σε μεθόδους για την αποφυγή της κατάρρευσης των κτηρίων μετά από σεισμό, το κόστος σε ανθρώπινες ζωές είναι σημαντικό. Η άμεση αποστολή μετά την κατάρρευση ενός κτηρίου είναι ο εντοπισμός και η διάσωση των εγκλωβισμένων. Ο χρόνος εγκλωβισμού σε αυτές τις περιπτώσεις είναι κρίσιμος για την επιβίωση. Σαν γενικός κανόνας, οι 24 ώρες αποτελούν το χρονικό όριο, για την επιβίωση του μεγαλύτερου αριθμού των εγκλωβισμένων ενώ μέχρι τις 72 ώρες, ο αριθμός αυτός μειώνεται σημαντικά.

Αν και οι διασωστικές ομάδες σήμερα έχουν την ευχέρεια της χρήσης συσκευών που αφορά συνήθως ακουστικά όργανα, τηλεοπτικές ή θερμικές μικρό-κάμερες, το πιο χρήσιμο «διασωστικό εργαλείο» στον εντοπισμό εγκλωβισμένων παραμένουν οι εκπαιδευμένοι σκύλοι.

Η έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί στο πεδίο του εντοπισμού των εγκλωβισμένων είναι ελάχιστη και κυρίως με επιχειρησιακό χαρακτήρα. Γίνεται ωστόσο φανερό, ότι η αξιοποίηση νέων τεχνολογιών, για την αύξηση της αποτελεσματικότητας των επιχειρήσεων διάσωσης είναι ένα βήμα για πιο μεθοδευμένη και συστηματική έρευνα στο χώρο αυτό.

Με βάση το παραπάνω πλαίσιο, έγινε προσπάθεια μελέτης του χημικού προφίλ που εκλύουν οι εγκλωβισμένοι, με προσομοίωση της κατάστασης τους, με στόχο την διερεύνηση της χρήσης και ενσωμάτωση της χημικής πληροφορίας σε συσκευές πεδίου για τον εντοπισμό των εγκλωβισμένων.

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΙ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή υπηρετεί τον ευρύτερο στόχο της ανάπτυξης μιας νέας χημικής μεθόδου για τον εντοπισμό εγκλωβισμένων σε ερείπια κτηρίων που έχουν καταρρεύσει μετά από σεισμό.

Οι σκοποί της παρούσας διδακτορικής διατριβής περιλαμβάνουν:

1. Την προσομοίωση των καταστάσεων εγκλωβισμού με ομάδες ικανές να αποτελέσουν το πειραματικό υλικό μελέτης του χημικού προφίλ των εγκλωβισμένων ανθρώπων.

Επιμέρους στόχοι για την επίτευξη του πιο πάνω σκοπού μεταφράζονται στα εξής:

- Ταξινόμηση των διαφορετικών καταστάσεων εγκλωβισμού βασισμένη σε παράγοντες όπως ο χρόνος εγκλωβισμού και η κρισιμότητα των τραυμάτων λόγω της κατάρρευσης.
 - Η περιγραφή και σύνδεση των διαφορετικών καταστάσεων εγκλωβισμού με βιοχημικούς όρους (νευροενδοκρινικές, σωματικές και μεταβολικές αντιδράσεις).
 - Επιλογή ομάδων προσομοίωσης των καταστάσεων εγκλωβισμού.
2. Η χρήση της Μεταβολομικής (Metabolomics) για την σύνδεση των προσομοιούμενων καταστάσεων εγκλωβισμού με Πτητικές Οργανικές Ενώσεις, πρωτίστως στον εκπνεόμενο αέρα και δευτερευόντως στο αίμα και τα ούρα των ομάδων μελέτης.

Τα στοιχεία πρωτοτυπίας που εμφανίζονται στην παρούσα διδακτορική διατριβή αφορούν τα παρακάτω:

Η εφαρμογή της χημικής ανάλυσης και της χημικής πληροφορίας που προέρχεται από την μελέτη των πτητικών οργανικών ενώσεων στον εκπνεόμενο αέρα, το αίμα και τα ούρα ανθρώπων που έχουν εγκλωβιστεί σε ερείπια κτηρίων, μετά από σεισμό αποτελεί το βασικό στοιχείο πρωτοτυπίας της παρούσας διατριβής. Μέχρι σήμερα όλη η ανάπτυξη που αφορά τις συσκευές που χρησιμοποιούνται στις επιχειρήσεις εντοπισμού και διάσωσης εγκλωβισμένων βασίζεται σε οπτικές και ακουστικές μεθόδους.

Επιπλέον η ανάπτυξη μεθοδολογίας, για την πειραματική προσέγγιση του προβλήματος με παραμέτρους εισόδου τον χρόνο εγκλωβισμού και την σοβαρότητα των τραυματισμών και παραμέτρους εξόδου τις μεταβολικές διεργασίες που πραγματοποιούνται με σκοπό την σύνδεση τους με τις πτητικές οργανικές ενώσεις, αποτελεί μια εντελώς καινούργια προσέγγιση στον χώρο του εντοπισμού και της διάσωσης εγκλωβισμένων.

Ειδικότερα, στα πλαίσια των πειραματικών μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν για την προσέγγιση των διαφορετικών καταστάσεων εγκλωβισμού που δημιουργούνται μετά από ένα σεισμό προέκυψαν πρωτότυπες σειρές μετρήσεων όπως:

Η μελέτη του χημικού προφίλ που προέρχεται από τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των πτητικών οργανικών ενώσεων στον εκπνεόμενο αέρα, το αίμα και τα ούρα υγιών εθελοντών, που αποτέλεσαν την ομάδα αναφοράς.

Η μελέτη του χημικού προφίλ των πτητικών οργανικών ενώσεων στον εκπνεόμενο αέρα για ομάδα ανθρώπων με έντονο στρες, και ομάδες εθελοντών με αποχή από τροφή και νερό για διάστημα 3 ημερών.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

- 📖 Βιβλιογραφική μελέτη του εύρους (κατηγορίες ενώσεων, πολικότητα, μοριακά βάρη, συγκέντρωση κ.α.) των πτητικών οργανικών ενώσεων στον εκπνεόμενο αέρα, το αίμα και τα ούρα υγιών εθελοντών.
- 📖 Επιλογή μεθοδολογίας ανάλυσης εκπνεόμενου αέρα, αίματος και ούρων
- 📖 Διεπιστημονική συνεργασία για την ανάπτυξη πρωτοκόλλου συλλογής δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα, αίματος και ούρων (Ιατροδικαστική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, Ψυχιατρικό Τμήμα Αιγινήτειου Νοσοκομείου, Τμήμα Νοσηλευτικής ΤΕΙ Ηπείρου)

- 📖 Πρώτη σειρά μετρήσεων: πτητικών οργανικών ενώσεων σε εκπνεόμενο αέρα, αίμα και ούρα ομάδας φυσιολογικών εθελοντών. Τα αποτελέσματα αποτέλεσαν το προφίλ των ενώσεων αναφοράς για σύγκριση με τις υπόλοιπες προς μελέτη ομάδες. Η πρωτοτυπία των μετρήσεων αυτών, αν κι επρόκειτο για μετρήσεις αναφοράς, ήταν χαρακτηριστική, λόγω του ταυτόχρονου προσδιορισμού πτητικών οργανικών ενώσεων και στις τρεις βιολογικές εκκρίσεις του ανθρώπινου οργανισμού.
- 📖 Ταξινόμηση των διαφορετικών καταστάσεων εγκλωβισμού σε κατηγορίες με αρχικά κριτήρια τον χρόνο εγκλωβισμού και την σοβαρότητα των τραυματισμών. Διεπιστημονική συνεργασία για την περιγραφή των καταστάσεων αυτών με γνώμονα τις νευροενδοκρινικές αντιδράσεις, τις σωματικές και κατ' επέκταση τις μεταβολικές αντιδράσεις. Η ανάπτυξη του μοντέλου πρόβλεψης της πιθανής κατάστασης των εγκλωβισμένων με δεδομένα εισόδου τον χρόνο εγκλωβισμού και την σοβαρότητα των τραυματισμών και δεδομένα εξόδου την σύνδεση της κάθε κατάστασης με μεταβολικές διεργασίες, υπήρξε διευκρινιστική για την μετέπειτα επιλογή των ομάδων προσομοίωσης των καταστάσεων εγκλωβισμού.
- 📖 Δεύτερη σειρά μετρήσεων: πτητικών οργανικών ενώσεων στον εκπνεόμενο αέρα ομάδας ατόμων με έντονο στρες που προσομοιάζει με την πρώτη κατηγορία του μοντέλου πρόβλεψης της κατάστασης των εγκλωβισμένων.
- 📖 Στα πλαίσια του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2001, κατασκευάστηκε η νέα έκδοση της μονάδας θερμικής εκρόφησης που χρησιμοποιείται σαν διαφορετικό σύστημα εισαγωγής, για την ανάλυση των δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα, συνδεδεμένο με αέριο χρωματογράφο-φασματοόμετρο μάζας. Μετά την διαδικασία κατασκευής πραγματοποιήθηκε σειρά μετρήσεων για την αριστοποίηση των διαφορετικών τμημάτων την μονάδας. Σκοπός των πειραμάτων αυτών υπήρξε η ανάπτυξη της μεθόδου για την ανάλυση των δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα.
- 📖 Τρίτη σειρά μετρήσεων πτητικών οργανικών ενώσεων στον εκπνεόμενο αέρα εθελοντών σε τριήμερη αποχή από φαγητό και νερό. Οι μετρήσεις αυτές αφορούσαν δυο ξεχωριστές ομάδες εθελοντών. Η μια αποτελούμενη από άνδρες εθελοντές και η άλλη από γυναίκες.

Από την έρευνα που σημειώθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή, προέκυψαν τρεις δημοσιεύσεις στα περιοδικά Journal of Chromatography B (2) και στο Analytica Chimica Acta (1).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, εξετάζεται η χρήση της μεταβολομικής του ανθρώπινου οργανισμού, σαν εργαλείο για την εισαγωγή της χημικής πληροφορίας που προέρχεται από τον εκπνεόμενο αέρα το αίμα και τα ούρα, στον εντοπισμό ανθρώπων που έχουν εγκλωβιστεί σε κτήρια που έχουν καταρρεύσει μετά από σεισμό.

Η μεθοδολογία περιλαμβάνει αρχικά, την ανάπτυξη μιας «θεωρίας εγκλωβισμού» με στόχο την ταξινόμηση και περιγραφή των διαφορετικών καταστάσεων εγκλωβισμού που προκύπτουν, με παραμέτρους τον χρόνο εγκλωβισμού και την σοβαρότητα των τραυματισμών. Η περιγραφή των καταστάσεων πραγματοποιήθηκε με όρους νευροενδοκρινικών, σωματικών και μεταβολικών αντιδράσεων που χαρακτηρίζουν την κάθε περίπτωση, ώστε να γίνει επιλογή των ομάδων των εθελοντών που προσομοιάζουν τις διαφορετικές καταστάσεις.

Για τις ομάδες των εθελοντών που εξετάστηκαν ακολούθησε σύγκριση και έλεγχος των διαφοροποιήσεων που εμφανίζονται στο σύνολο των πτητικών οργανικών ενώσεων του εκπνεόμενου αέρα σαν αποτέλεσμα των διαφορετικών ή πιο έντονων μεταβολικών διεργασιών για την κάθε κατάσταση.

Αρχικά για ομάδα φυσιολογικών εθελοντών προσδιορίστηκαν οι οργανικές ενώσεις που προκύπτουν μετά από ταυτόχρονο έλεγχο, στον εκπνεόμενο αέρα, το αίμα και τα ούρα. Κοινή ουσία και για τα τρία μέσα προσδιορίστηκε η ακετόνη, ενώ το ισοπρένιο εμφανίζεται στον εκπνεόμενο αέρα και το αίμα. Ακολούθησαν μετρήσεις πτητικών οργανικών ενώσεων στον εκπνεόμενο αέρα, ομάδας εθελοντών με έντονο στρες, από τις οποίες προέκυψαν αυξημένα ποσοστά υδρογονανθράκων και κυρίαρχη ένωση την ακετόνη. Τέλος για δύο ομάδες εθελοντών (άνδρες και γυναίκες) που απείχαν από τροφή και νερό για τρεις μέρες προσδιορίστηκαν οι πτητικές οργανικές ενώσεις στον εκπνεόμενο αέρα. Οι μετρήσεις έδειξαν δραματική αύξηση στην ποσότητα της ακετόνης που προσδιορίστηκε, λόγω της αυξημένης παραγωγής των κετοσωμάτων. Μεγάλα ποσοστά προσδιορίστηκαν και για τις ενώσεις ισοπρένιο, φαινόλη και 2-πεντανόνη.

Μελλοντικά προτείνεται η μελέτη στοχευμένων πτητικών οργανικών ενώσεων σε μεγαλύτερα δείγματα εθελοντών. Η μελέτη κι άλλων χαρακτηριστικών ομάδων εθελοντών όπως πολυτραυματίες ή άνθρωποι με πανικό κ.α. Επιπλέον λόγω του μεγάλου όγκου της χημικής πληροφορίας που προκύπτει από τις μετρήσεις στον εκπνεόμενο αέρα κρίνεται σκόπιμο η ενίσχυση της εξαγωγής και στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων με χημειομετρικά εργαλεία.

Λέξεις Κλειδιά

(μεταβολομική, πτητικές οργανικές ενώσεις, εκπνεόμενος αέρας, αίμα, ούρα, σεισμός, εγκλωβισμός, επιχειρήσεις εντοπισμού και διάσωσης)

ABSTRACT

The scope of the present thesis is the examination of using the chemical information derive from expired air, blood and urine in connection with metabolomics of human organism for enhancing search and rescue efforts after an earthquake.

Firstly, a specialized theory is proposed for the classification and description of the various categories of people entrapped by building collapse during an earthquake. The classification is based on two operational factors; degree of injuries occurred at the moment of building collapse and duration of entrapment. The description is made on the basis of the possible neuroendocrine, metabolic and physical responses of the potential victims.

Furthermore, groups of human volunteers were selected for simulating different states of entrapment as conducted by the proposed theory. The volatile organic compounds (VOCs) derive from expired air were examined for the differentiations shown in the various categories of entrapment, as a result of different or most intense metabolic processes of the human body.

A reference group consisted of healthy volunteers was examined for the VOCs content derive from expired air, blood and urine samples. Results shown that common substance in all three matrixes is acetone whereas isoprene is the substance which is shown in both expired air and blood samples. Moreover VOCs found in expired air of a group of volunteers with intense stress has shown an increase in the total rate of hydrocarbons while acetone prevails again. Two group of volunteers consisted of men and women which abstain from food and water for a three days period were examined as well. VOCs derive from expired air samples for both groups reveal a dramatic increase for acetone. Furthermore increased rates were shown for isoprene, phenol and 2-pentanone.

Future work will focus on the determination of specific VOCs in larger number of volunteers along with various other groups of volunteers that simulate other states of entrapment such as multi-injured volunteers or people with panic attacks etc. Additionally the use of chemometrics for quick data exportation and statistical elaboration is essential for managing the large data sets of chemical information.

KeyWords

(metabolomics, simulation, VOCs, expired air, urine, blood, earthquake, entrapment, search and rescue efforts)

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΕΙΣΜΩΝ

Οι σεισμοί ανήκουν στις φυσικές καταστροφές που έχουν τεράστιες συνέπειες στους ανθρώπους και στο περιβάλλον. Οι απώλειες σε ανθρώπινες ζωές και στις κατασκευές είναι πολύ μεγάλες, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ισχυρών σεισμών και μάλιστα για συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές. Από το 1900 έως το 1990 έγιναν πάνω από 1000 σεισμοί μεγέθους πάνω από 7 Richter. Τουλάχιστον σε 650 από αυτούς υπήρξαν νεκροί που υπολογίζονται σε 1.300.000. Οι 5 μεγαλύτεροι σεισμοί από αυτούς ήταν υπεύθυνοι για το 50% των νεκρών οι 20 μεγαλύτεροι για το 80% των νεκρών. Περίπου το 50% των θανάτων αυτών παρουσιάστηκε στην Κίνα, όπου η πληθυσμιακή πυκνότητα είναι εξαιρετικά υψηλή, τα κτίρια είναι ευπαθή και οι σεισμοί είναι δυνατοί και συχνοί.

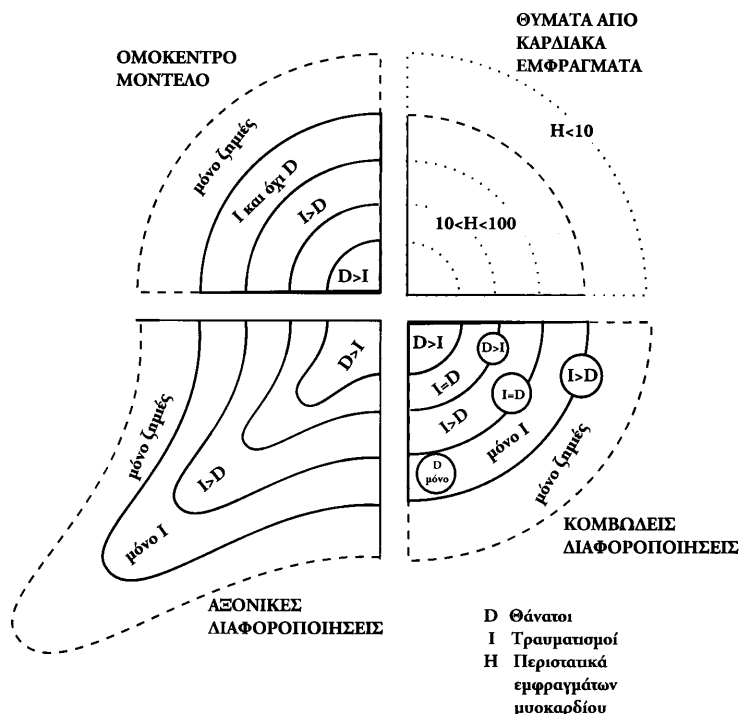
Στους μεγάλους σεισμούς η θνησιμότητα υπερβαίνει το 10% του πληθυσμού που κατοικεί σε συγκεκριμένου τύπου κατασκευές μέσα στη ζώνη του επίκεντρου, ενώ μερικές πληγείσες περιοχές μπορεί να παρουσιάσουν θνησιμότητα μέχρι και 85%. Σύμφωνα με κάποιους ερευνητές, οι τραυματισμοί είναι συνήθως τριπλάσιοι των θανάτων, αν και ποτέ δε δόθηκε ακριβής ορισμός του όρου «τραυματισμός». Για σεισμούς με μεγέθη μεταξύ 5 και 7 της κλίμακας Richter, παρατηρούμε 3 τραυματισμούς ανά 1 θάνατο. Ο αριθμός των τραυματισμών και των θανάτων μειώνεται δραστικά όσο απομακρυνόμαστε από το επίκεντρο ή τη ρηξιγενή ζώνη, όπου τότε μόνο μεμονωμένα περιστατικά παρατηρούνται. Η πολυπλοκότητα του αστικού περιβάλλοντος, όπως ο τύπος των κατοικιών και η κτιριακή πυκνότητα, καθώς και η έλλειψη ομοιομορφίας των γεωλογικών παραγόντων συντείνει στην πολυπλοκότητα της κατανομής και του τύπου των καταστροφών αλλά και των θανάτων ή τραυματισμών.

Τα παραπάνω φαίνονται αναλυτικότερα στο Σχ.1.1 όπου παρουσιάζεται ένα χωρικό μοντέλο καταστροφής και δίνονται τέσσερις υποθέσεις που αφορούν στην πιθανή εξάπλωση των δυστυχημάτων. Στο ομόκεντρο μοντέλο, ο αριθμός των θανάτων είναι μεγαλύτερος από τον αριθμό των τραυματισμών κοντά στην περιοχή του επίκεντρου, όπου συγκεντρώνεται και η κατάρρευση των κτιρίων.

Καθώς απομακρυνόμαστε από το επίκεντρο, οι αριθμοί των θανάτων και των τραυματισμών σχεδόν εξισώνονται και όσο περισσότερο μετακινούμαστε προς την περιφέρεια της πληγείσας περιοχής ο βαθμός απωλειών μειώνεται και περιορίζεται μόνο σε βλάβες των κτιρίων. Σε σεισμούς που προκαλούν μικρό ποσοστό καταρρεύσεων, ο μεγαλύτερος αριθμός θανάτων οφείλεται σε καρδιακά επεισόδια.

Αυτά τα δύο μοντέλα όπως φαίνεται και στο Σχ.1.1, θεωρούν ότι οι μεταβολές είναι ισοτροπικές, όμως είναι πιο ρεαλιστικό να αναμένονται μεταβολές αξονικού ή κομβικού τύπου. Για παράδειγμα, μια ρηξιγενής ζώνη μπορεί να δίνει ισόσειστες καμπύλες αλλά και να δημιουργεί έναν άξονα κατά μήκος του οποίου παρατηρούνται δομικές καταστροφές και επομένως δυστυχήματα. Επιπρόσθετα, η πληθυσμιακή συγκέντρωση στις μεγάλες πόλεις και κοινότητες, καθώς και η συνήθως συνεπαγόμενη συσσώρευση τρωτών κατασκευών, οδηγεί στη δημιουργία κόμβων στους οποίους συγκεντρώνονται τα περιστατικά των δυστυχημάτων - αντίθετα με τη γενικότερη ομοκεντρική διασπορά των καταστροφών και των δυστυχημάτων. Μερικά από αυτά τα μοντέλα δοκιμάστηκαν στις περιπτώσεις των σεισμών του 1978 στο

Tabas-e-Golshan (Iran) και του 1980 στην Irpinia (νότια Ιταλία), όπου παρατηρήθηκε ότι ισχύουν σε μεγάλο βαθμό [Alexander D. 1993, Λέκκας Λ.Ε. 1995].



Σχήμα 1.1: Τέσσερις υποθέσεις για την κατανομή των δυστυχημάτων σε ένα σεισμό σε σχέση με την απόσταση από το επίκεντρο [Λέκκας Λ.Ε. 1995].

1.2 ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΙΣ ΔΙΑΣΩΣΗΣ

Μετά την κατάρρευση κτιρίων από ένα καταστροφικό σεισμό, οι ομάδες διάσωσης καλούνται να προβούν σε συντονισμένες ενέργειες ώστε να εντοπίσουν και να απεγκλωβίσουν τα παγιδευμένα άτομα. Όσο αυξάνεται ο χρόνος παραμονής των εγκλωβισμένων στα ερείπια τόσο μειώνονται οι πιθανότητες επιβίωσής τους. Στον πίνακα 1 δίνεται το ποσοστό των ατόμων που βρέθηκαν ζωντανοί κάτω από τα ερείπια σε συνάρτηση με το χρόνο, μετά το σεισμό στην Αρμενία το 1988. Συνήθως μετά από ένα καταστροφικό σεισμό οι περιπτώσεις κτιρίων που καταρρέουν είναι αρκετές σε αριθμό, ώστε η ανάγκη για άμεση οργάνωση της επιχείρησης διάσωσης να γίνεται επιτακτική.

Καταρχήν η επιχείρηση διάσωσης προσανατολίζεται στον εντοπισμό των ατόμων που βρίσκονται στην επιφάνεια των ερειπίων, ή όπως ονομάζονται «αφρός». Είναι άτομα που χτυπήθηκαν από οικοδομικά υλικά κατά την κατάρρευση του κτιρίου, τα οποία συνήθως είναι ελαφρά τραυματισμένα και αποτελούν το 50% των εγκλωβισμένων που τελικά επιβιώνουν. Στη συνέχεια εντοπίζονται τα άτομα που είναι ελαφρώς παγιδευμένα πίσω από κάποιο έπιπλο ή κάτω από ελαφριά οικοδομικά υλικά που μπορούν να μετακινηθούν σχετικά εύκολα. Το 30% του συνόλου των ατόμων που επιβιώνουν τελικά ανήκουν σ' αυτή την κατηγορία.

Άλλη κατηγορία παγιδευμένων είναι αυτοί που βρίσκονται στα κενά, που δημιουργούνται από τα συντρίμια, χωρίς να μπορούν να μετακινηθούν και αποτελούν το 15% των ατόμων που καταφέρνουν να επιζήσουν τελικά. Ο μέσος όρος του χρόνου που απαιτείται για τον απεγκλωβισμό αυτών των ανθρώπων είναι περίπου 4 ώρες με τη βοήθεια 10 άριστα εκπαιδευμένων διασωστών. Σε περίπτωση που κάποιος είναι εγκλωβισμένος σε αρκετό βάθος κάτω από βαριά οικοδομικά υλικά, όπως τοίχο ή κάποιο δοκάρι, ο ελάχιστος χρόνος που απαιτείται για τον απεγκλωβισμό τους από έμπειρη ομάδα διάσωσης είναι 10 ώρες [Murphy R.R et al. 2000].

Μέχρι σήμερα οι συνήθεις μέθοδοι εντοπισμού των εγκλωβισμένων είναι οι ειδικά εκπαιδευμένοι σκύλοι, οι ηχο-εντοπιστικές συσκευές, η αυτοψία από εμπειρογνώμονες και αξιοποίηση των πληροφοριών που δίνονται από συγγενείς των εγκλωβισμένων ή από γείτονες.

Πίνακας 1.1: Ποσοστό παγιδευμένων που επέζησαν στα ερείπια συναρτήσεως του χρόνου εγκλωβισμού τους, στο σεισμό της Αρμενίας το 1988 [Murphy R.R et al. 2000]

Χρόνος	Επιζήσαντες (%)
30 λεπτά	91
1 μέρα	81
2 μέρες	36,7
3 μέρες	33,7
4 μέρες	19
5 μέρες	7,4

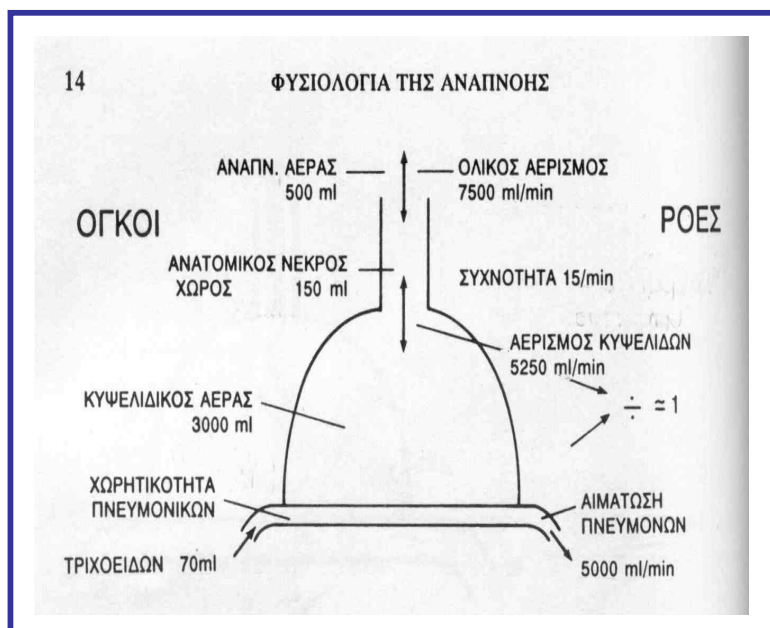
1.3 ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ & ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΟΣ

Κατά τον εγκλωβισμό ο ανθρώπινος οργανισμός υφίσταται διαφόρων επιπέδων καταπονήσεις. Καταρχήν υφίσταται εξαιρετικά έντονο στρες που προέρχεται από την αίσθηση του μεγάλου κινδύνου που διατρέχει. Ακολούθως είναι εξαιρετικά πιθανό να υποστεί τραυματισμό διαφόρων επιπέδων και τέλος ανάλογα με τη διάρκεια του εγκλωβισμού μπορεί να υποστεί την έλλειψη φαγητού και νερού. Από ιατρικής απόψεως η κατάσταση αυτή είναι ιδιαίτερα σύνθετη με την εμφάνιση διαφορετικών βιοχημικών, νευροενδοκρινικών και σωματικών διαταραχών. Ένας τρόπος παρακολούθησης τους είναι μέσω των προϊόντων μεταβολισμού και συγκεκριμένα μέσω των μικρού μοριακού βάρους μεταβολικών προϊόντων. Τα προϊόντα αυτά βρίσκονται τόσο στον εκπνεόμενο αέρα όσο και στα διάφορα βιολογικά υγρά (αίμα, ούρα) ή τις εκκρίσεις του ανθρώπινου οργανισμού (ιδρώτας, σάλιο). Η φυσιολογική και σωστή λειτουργία των οργάνων του ανθρώπινου οργανισμού αλλά και οι πιθανές διαταραχές στον μεταβολισμό του, έχουν άμεσο και μετρήσιμο αντίκτυπο στις εκκρίσεις και τον εκπνεόμενο αέρα του. Τόσο οι ανθρώπινες εκκρίσεις όσο και ο εκπνεόμενος αέρας περιέχουν ένα ευρύ φάσμα από πτητικές ουσίες (οργανικές-ανόργανες) οι οποίες θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα ισχυρό εργαλείο για την ανίχνευση εγκλωβισμένων κάτω από ερείπια γκρεμισμένων κτιρίων.

Με τον όρο πτητικές οργανικές ενώσεις (*VOC's = Volatile Organic Compounds*), εννοούμε ουσίες που έχουν τάση ατμών (P^s) πάνω από 0.1 Torr στους 25°C και 760 mmHg ή διαφορετικά ουσίες που πρακτικά έχουν 1 ως 12 άτομα άνθρακα και σημείο ζέσεως κάτω από 300°C . Οι ουσίες αυτές στην αέρια φάση έχουν συγκεντρώσεις στην περιοχή από 10-5000 ppt (0.1 ως 50 nmol L^{-1}).

1.4 ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΣ ΑΕΡΑΣ

Κάθε άνθρωπος επιτελεί **15 αναπνοές το λεπτό** με **εκπνεόμενο όγκο** σε κάθε αναπνοή **500 ml**. **Ο συνολικός εκπνεόμενος όγκος** αέρα σε κάθε λεπτό είναι **7500 ml/min**. Ο όγκος αυτός ονομάζεται *ολικός πνευμονικός αερισμός*. Ο όγκος του αέρα που εισέρχεται στους πνεύμονες είναι ελαφρώς μεγαλύτερος από τον όγκο του αέρα που εξέρχεται επειδή ο όγκος του οξυγόνου που προσλαμβάνεται από τον οργανισμό είναι μεγαλύτερος από τον όγκο του διοξειδίου του άνθρακα που αποβάλλεται. Δεν φθάνει όμως όλος ο εισπνεόμενος όγκος στον κυψελιδικό χώρο όπου πραγματοποιείται η ανταλλαγή των αερίων. Σε κάθε 500 ml εισπνεόμενου αέρα τα 150 ml παραμένουν μέσα στον ανατομικό νεκρό χώρο. **Ο όγκος λοιπόν του καθαρού αέρα** που εισέρχεται **στην αναπνευστική ζώνη** κάθε λεπτό είναι $(500-150)*15=$ **5250 ml/min**. Ο όγκος αυτός ονομάζεται *κυψελιδικός αερισμός* και αντιπροσωπεύει το ποσό από τον εισπνεόμενο αέρα που διατίθεται για την ανταλλαγή των αερίων [West B.J., 1996].



Σχήμα 1.2: Σχηματική παράσταση του αναπνευστικού συστήματος [West B.J. 1996].

Οι ανάγκες των πνευμόνων για την ανταλλαγή των αερίων αυξάνουν σημαντικά κατά τη διάρκεια της άσκησης. Τυπικά η κατανάλωση οξυγόνου αυξάνει από 300 στα 3000 ml/min σε ένα μέτρια εξασκημένο άνθρωπο, ενώ μπορεί να φθάσει τα 6000 ml/min σε ένα υψηλών αποδόσεων αθλητή. Αντίστοιχα **η παραγωγή CO_2** που σε κατάσταση ηρεμίας είναι **240 ml/min** αυξάνει σε **3000 ml/min** περίπου [West B.J. 1996]

Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ο καπνός του τσιγάρου περιέχει περίπου **4% μονοξείδιο του άνθρακα**, ποσό που είναι αρκετό για να αυξήσει τα επίπεδα της καρβόξυαιμοσφαιρίνης του αίματος του καπνιστού στο 10%, ποσότητα που είναι ικανή να μειώσει την άσκηση και τη διανοητική λειτουργία [West B.J. 1993].

Σε μια αντίστοιχη επιστημονική έρευνα για τον προσδιορισμό των VOC's της ανθρώπινης εκπνοής αναφέρεται ότι σε ένα δείγμα 50 υγιών εθελοντών ανιχνεύτηκαν 3481 διαφορετικά VOC's, εκ των οποίων τα 1741 χαρακτηρίστηκαν **ενδογενή** (με θετική κυψελιδική κλίση = ποσότητα στα αέρια της εκπνοής-ποσότητα στον εισπνεόμενο αέρα) και τα υπόλοιπα 1728 **εξωγενή**. Ένα μέσο δείγμα αερίων εκπνοής περιείχε 204,2 VOC's. Συνολικά αναφέρεται ότι βρέθηκαν 27 κοινά VOC's σε όλους τους εθελοντές (9 ενδογενή = isoprene, benzene 1-methylethenyl, naphthalene, 2,5-cyclohexadiene-1,4-dione,2,6-bis, naphthalene1-methyl, butane2-methyl, tetradecane, pentodecane, dodecane και 28 εξωγενή = benzene, benzene1-ethyl-2-ethyl, benzene ethyl, benzene methyl, benzene propyl, cyclohexane methyl, decane, heptane, heptane 2-methyl, heptane 3-methyl, hexane, hexane 3-methyl, nonane, pentane 2,3,4-trimethyl, pentane 2-methyl, pentane 3-methyl, propane 2-methoxy-2-methyl, undecane) [Phillips M. et al. 1996]

Πίνακας 1.2: Εκατοστιαίες συγκεντρώσεις (%) των αερίων της αναπνοής κατά την είσοδο και κατά την έξοδο τους από τους πνεύμονες [Gyuton A., 1990].

	ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΙΚΟΣ ΑΕΡΑΣ	ΑΕΡΑΣ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟΣ ΜΕ ΥΔΡΑΤΜΟΥΣ	ΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟΣ ΑΕΡΑΣ	ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΣ ΑΕΡΑΣ
N₂	78,62	74,09	74,9	74,5
O₂	20,84	9,67	13,6	15,7
CO₂	0,04	0,04	5,3	3,6
H₂O	0,50	6,20	6,2	6,2

1.5 ΟΥΡΑ

Κατά την φυσιολογική νεφρική λειτουργία για την παραγωγή ούρων: ένα ποσοστό που κυμαίνεται από το **16-20% του πλάσματος του αίματος** που εισέρχεται στους νεφρούς διηθείται από τα σπειραματικά τριχοειδή στην κάψα του Bowman. Το διήθημα, αν και φυσιολογικά ελεύθερο από πρωτεΐνες και κύτταρα του αίματος, περιέχει τα **χαμηλότερου μοριακού βάρους συστατικά του πλάσματος**, σε περίπου ίδιες ποσότητες με αυτές του πλάσματος [Harvey A.R. et al. 1995].

Η ποσότητα των ούρων που παράγεται εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων όπως η πρόσληψη ύδατος, οι δραστηριότητες, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες και η συνολική κατάσταση υγείας. Σε ενήλικες, η μέση φυσιολογική απέκκριση **ανά 24ώρο**

είναι 1,5-2 L. Ωστόσο, διαταραχές στην ποσότητα των ούρων, εμφανίζονται σαν αποτέλεσμα διαφόρων μεταβολικών διαταραχών και περιλαμβάνουν τις:

- α) Πολυουρία, όταν η ποσότητα των ούρων ανά 24ώρο είναι > 2 L
- β) Ολιγουρία, όπου η ποσότητα των ούρων ανά 24ώρο είναι < 500 ml.
- γ) Ανουρία, όπου η ποσότητα των ούρων ανά 24ώρο είναι < 100 ml

Σε υγιή άτομα το pH των ούρων κυμαίνεται από 4,6-8, ανάλογα με την ποσότητα του οξέος που πρέπει να αποβληθεί από τον οργανισμό. Το pH των ούρων, σε ένα ενήλικα με φυσιολογική διατροφή, είναι περίπου 6 (ελαφρά όξινα) [Δημόπουλου Α.Κ. 1997].

Η χημική σύσταση των ούρων περιλαμβάνει μια μεγάλη ποικιλία ενώσεων που κυμαίνεται από ανόργανες ενώσεις όπως η αμμωνία μέχρι ορμόνες, ένζυμα, βιταμίνες και προσταγλαδίνες. Στον πίνακα 1.3 παρουσιάζεται η τυπική σύνθεση των ούρων.

Πίνακας 1.3: Κατηγορίες ενώσεων και κυρίαρχες ενώσεις ανθρώπινων ούρων

Κατηγορίες Ενώσεων	Κυρίαρχες Ενώσεις
Ανόργανες Ενώσεις	Αμμωνία
Αζωτούχες Ενώσεις	Ουρία, κρεατίνη, χολίνη, κρεατινίνη, πιπεριδίνη, καρνιτίνη, επινεφρίνη
Αμινοξέα	Αλανίνη, γλυκίνη, λευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, σερίνη, τυροσίνη, βαλίνη
Πρωτεΐνες	Αλβουμίνη, τρανσφερίνη, ανοσογλοβουλίνες
Ένζυμα	Ουροκινάση, πρωτεάση, άλφα αμυλάση
Υδατάνθρακες	Αραβινόση, γλυκόζη, γαλακτόζη, φρουκτόζη
Βιταμίνες	Θειαμίνη Β1, ριβοφλαβίνη Β2, νικοτινικό οξύ, ασκορβικό οξύ, Β12 και Β6
Ορμόνες	Γοναδοτροπίνη, προλακτίνη, βασοπρεσίνη, θυροξίνη, κατεχολαμίνες, ινσουλίνη, κορτικοστεροειδή, τεστοστερόνη
Προσταγλαδίνες, Εικοσανοειδή κ.α	

Η σύσταση των ούρων όσων αφορά τις πτητικές οργανικές ενώσεις που εμφανίζονται σε αυτά έχει γίνει αντικείμενο μελέτης στην βιβλιογραφία με συμπεράσματα που καταλήγουν σε ενός μεγάλου εύρους κατηγοριών ενώσεις που παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στο Σχ.1.3.

Acids	Aldehydes and alcohols	Amines	Food	Ketones	N-Hetero	O-Hetero	Solvents and contaminants	Sulfur compounds
Acetic	Benzaldehyde	Dimethylamine	Benzoic acid	Acetone	2-Cyano-2-butene	2-Acetylthiuran	2-Butoxyethanol	Dimethylsulfide
Acetic acid ethyl ester	Benzylalcohol	Trimethylamine	Car-2-n-4-one	2-Butanone	2,5-Dimethylpyrazine	2,5-Dimethylthiuran	Chloroform	Dimethyltrisulfide
n-Butyric	1-Butanol		1-Carved	3-Dimethyl-2-cyclopentene-1-one	1-Me-2-piperidinone	2-Ethyl-5-azethiuran	1-Ethyl-2,3-dimethylbenzene	1,3-Dithiacyclohexene
Butyric acid butyl ester	n-Hexanal		3-Carvo-menthone	Isocinnole	3-Mepyridine	2-Furanmethanol	3-Isothiocyanato-1-propene	3-Isothiocyanato-1-propene
Formic	1-Hexanol		Isocinnole	2-Heptanone	Me-1-pyrrole	2-Methiuran	2-Ethylhexanoic acid	5-Meisthiazole
Isovaleric/2-methylbutyric	3-Me-3-buten-1-ol		p-Cresol	4-Heptanone	Mepyrazine		2-Ethylhexanol	Me-2-propenyl-disulfide
n-Nonanoic	5-Me-3-hexanol		Cumylalcohol	3-Hexanone	Nicotine		Styrene	Me-propylsulfide
n-Octanoic	1-Octanol		Cymenene	3-Mecyclohexanone	Piperidine		Thymol	Methanethiol
	Phenol		p-Cymene-8-ol	2-Me-2-cyclopentene-1-one	Pyrazine		Toluene	2-Methylmercaptofuran
			β-Damascenone	3-Me-2-pentanone	Pyridine			
			Dihydromyrcenol	4-Me-2-pentanone	1H-Pyrole			
			trans-Ethlan	4-Me-3-pentene-2-one	2-Vinylpyrazine			
			Epoxy-butylated hydroxytoluene	2-Pentanone				
			Eucarvone					
			Furan					
			β-Ionone					
			α-Isophorone					
			Isopropyltoluene					
			Linalol					
			trans-Linalol oxide					
			Linalol oxide					
			Megastigmatrienone					
			Menthyl					
			Phenol					
			Pinene					
			β-Pinene					
			Pulegone					
			Santene					
			Sesquione					
			α-Terpinol					
			1-α-Terpinene					
			γ-Terpinene					
			Terpinene-1-ol					
			4-Terpinol					
			Vitaprene					

Σχήμα 1.3: Κατηγορίες πτητικών οργανικών ενώσεων που εμφανίζονται στα ανθρώπινα ούρα [Wahl G.H. et al. 1999].

1.6 AIMA

Το **αίμα** είναι ένας ρευστός συνδετικός ιστός που βρίσκεται σε συνεχή κίνηση μέσα στα αγγεία του σώματος παράλληλα με την λειτουργία της καρδιάς. Η κυκλοφορία του αίματος συμβάλλει στη διατήρηση ενός σχετικού εξωκυττάριου περιβάλλοντος το οποίο είναι απαραίτητο για την φυσιολογική λειτουργία και την επιβίωση όλων των κυττάρων του σώματος. Το αίμα αντιπροσωπεύει το 7% του συνολικού σωματικού βάρους και έχει μέση πυκνότητα σχεδόν 1060 kg/m^3 , πολύ κοντά στην τιμή της πυκνότητας του νερού (1000 kg/m^3). Το αίμα αποτελείται από ένα κίτρινο διαυγές υδατικό διάλυμα που λέγεται **πλάσμα** (55% του συνολικού ποσού αίματος) μέσα στο οποίο εναιωρούνται διάφορα κύτταρα γνωστά σαν **έμμορφα συστατικά ή κύτταρα του αίματος (ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα, αιμοπετάλια)**.

Ο συνολικός όγκος του αίματος που κυκλοφορεί στα αγγεία ποικίλει ανάλογα με την ηλικία και το φύλο. Ο φυσιολογικός όγκος για τους ενήλικες κυμαίνεται από **4,5-5,5 L.** για τις γυναίκες και από **5,0-6,0 L.** για τους άνδρες. Ενώ ο όγκος του πλάσματος κυμαίνεται κατά μέσο όρο από 2,7-3,0 L. Το pH του αίματος είναι ελαφρώς αλκαλικό (περίπου 7,4). Τα όρια του, που είναι συμβατά με την ζωή είναι αρκετά περιορισμένα και κυμαίνονται μεταξύ 7,0 και 7,8. Το pH του αίματος και του εξωκυττάριου υγρού διατηρείται σταθερό παρά το ότι εισέρχονται σε αυτό πολλές όξινες και αλκαλικές ουσίες, προϊόντα μεταβολισμού των κυττάρων του σώματος. Για την πλειονότητα του πληθυσμού που διατρέφεται με μικτή δίαιτα κρέατος και λαχανικών, στα προϊόντα του μεταβολισμού των κυττάρων επικρατούν οι όξινες έναντι των αλκαλικών ουσιών [Τσουκάτος Δ., Τσελέπης Α. 1998].

Ένας ενήλικας μπορεί να χάσει σχεδόν το 20% του συνολικού όγκου αίματος (1 L) πριν τα πρώτα συμπτώματα, νευρικότητα και το 40% του συνολικού όγκου αίματος (2 L) πριν ξεκινήσει η διαδικασία της καταπληξίας (σοκ, shock). Η έλλειψη νερού μπορεί να μειώσει τον όγκο του αίματος που οφείλεται στην μείωση του όγκου του ύδατος που περιέχεται σε αυτό. Η διαδικασία αυτή σπάνια καταλήγει σε shock (εκτός από πολύ έντονες περιπτώσεις) αλλά μπορεί να καταλήξει σε ορθοστατική υπόταση και λιποθυμία.

Οι κυριότερες λειτουργίες του αίματος συνίστανται στα παρακάτω:

Παροχή οξυγόνου στους ιστούς (σύνδεση του οξυγόνου με την αιμογλοβίνη που μεταφέρεται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια)

Παροχή θρεπτικών ουσιών όπως γλυκόζης, αμινοξέων και λιπαρών οξέων

Απομάκρυνση των άχρηστων ουσιών όπως το διοξείδιο του άνθρακα, η ουρία και το γαλακτικό οξύ

Ανοσολογική δράση, συμπεριλαμβανομένου της κυκλοφορίας των λευκών αιμοσφαιρίων και τον εντοπισμό των ξένων ενώσεων μέσω των αντισωμάτων

Πήξη, που αποτελεί μέρος του μηχανισμού αυτό-επιδιόρθωσης του οργανισμού.

Μεταφορά ορμονών και εκπομπής σήματος κατά την καταστροφή των ιστών

Ρύθμιση του pH του σώματος

Ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος

Πίνακας 1.4: Σύσταση ανθρώπινου αίματος εκφρασμένη σε ποσοστό % του συνολικού όγκου αίματος.

ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ	ΠΟΣΟΣΤΑ ΟΓΚΟΥ (%)
Πλάσμα	55
Ερυθρά Αιμοσφαίρια	≈ 42
Λευκά Αιμοσφαίρια	≈ 0,08
Αιμοπετάλια	≈ 3,5
ΠΛΑΣΜΑ	ΠΟΣΟΣΤΑ ΟΓΚΟΥ (%)
Νερό	92
Πρωτεΐνες πλάσματος (αλβουμίνη, ανοσοσφαιρίνες κ.α.)	8

Οι ουσίες που προσδιορίζονται συνήθως στο αίμα για ιατρικούς λόγους αφορούν κατά κύριο λόγο την ανάλυση ποσοστού λευκών, ερυθρών κυττάρων, πρωτεϊνούχων ενώσεων όπως τα αμινοξέα κ.α. Η βιβλιογραφία της μελέτης των πτητικών οργανικών ενώσεων σε αυτό έπεται κατά πολύ. Στον πίνακα 1.5 εμφανίζονται οι πτητικές οργανικές ενώσεων που έχουν προσδιοριστεί σε δείγματα αίματος στην βιβλιογραφία.

Πίνακας 1.5: Πτητικές οργανικές ενώσεις που έχουν ανιχνευτεί στο ανθρώπινο αίμα [Deng C. et al 2004, Sexton K. et al. 2006]

A/A	ΕΙΔΟΣ
1	Benzene
2	Toluene
3	m,p, o Xylene
4	Ethylbenzene
5	Styrene
6	1,3,5 Trimethylbenzene
7	1,1,1 Trichloroethane
8	Trichloroethene
9	Tetrachloroethene
10	Tetrachloromethane
11	1,2 Dichlorobenzene
12	1,3 Dichlorobenzene
13	1,4 Dichlorobenzene
14	Acetone
15	Hexanal
16	Heptanal

Σημαντική κατηγορία ενώσεων που εμφανίζονται στην κυκλοφορία του αίματος είναι και οι ορμόνες. Οι **ορμόνες** είναι ουσίες που παράγονται και εκκρίνονται από τους ενδοκρινείς αδένες και χρησιμεύουν στη μεταφορά των πληροφοριών από ένα κύτταρο σε ένα άλλο. Το κύτταρο που δέχεται την δράση της ορμόνης λέγεται κύτταρο στόχος. Όταν μια ορμόνη δρα σε μακρινό κύτταρο στόχο και μεταφέρεται εκεί με το αίμα τότε η δράση της είναι ενδοκρινική, όταν δρα σε ένα γειτονικό κύτταρο στόχο και μεταφέρεται εκεί με το μεσοκυττάριο υγρό η δράση της είναι **παρακρινική**, ενώ όταν το κύτταρο στόχος είναι το ίδιο το κύτταρο που την παράγει η δράση λέγεται **αυτοκρινική**.

Όλες οι ορμόνες του σώματος μπορούν να ταξινομηθούν σε 3 κατηγορίες με βάση τη δομή τους: στα παράγωγα αμινοξέων (κατεχολαμίνες, ορμόνες θυρεοειδή αδένου), τις πεπτιδικές ή πρωτεϊνικές ορμόνες (πολυπεπίδια) και τις στεροειδείς ορμόνες (ανδρογόνα, οιστρογόνα, γλυκοκορτικοειδή κ).

Η δράση των ορμονών δεν υπακούει ένα και μόνο μηχανισμό αλλά αρκετούς. Όλοι όμως έχουν ένα κοινό χαρακτηριστικό, το ότι ενισχύουν το σήμα που μεταφέρει η ορμόνη στο κύτταρο στόχο. Αυτό το φαινόμενο δίνει την δυνατότητα στις ορμόνες να είναι ισχυροί κυτταρικοί ενεργοποιητές παρά το ότι βρίσκονται στο αίμα σε απειροελάχιστες ποσότητες, συνήθως μικρότερες από 10^{-9} M [Carlson P. et al. 1998].

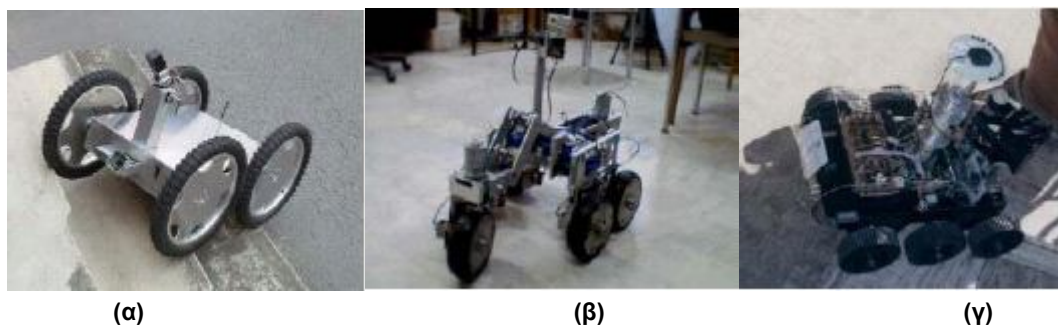
1.7 STATE OF THE ART- ΣΤΙΣ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΙΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ & ΔΙΑΣΩΣΗΣ ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΕΝΩΝ

1.7.1 Ρομπότ Εντοπισμού & Διάσωσης

Η έρευνα που διεξάγεται παγκοσμίως για τον εντοπισμό και την διάσωση εγκλωβισμένων μέσα από τα ερείπια κτηρίων αφορά, κατά κύριο λόγο, την ανάπτυξη ρομπότ. Τα ρομπότ εμφανίζονται σαν την ιδανική λύση για τις περιπτώσεις εκείνες

που η επικινδυνότητα του χώρου και η δυσκολία προσέγγισης είναι απαγορευτική για τους ειδικούς διασώστες ή τους εκπαιδευμένους σκύλους.

Παρόλο που η έρευνα και η ανάπτυξη των ρομπότ μετράει δεκαετίες, εντούτοις η εξειδίκευση τους στον χώρο του εντοπισμού και της διάσωσης ανθρώπων ξεκίνησε μόλις το 1996 στις Η.Π.Α.. Την άνοιξη του 2000, το πρόγραμμα Κινητών Ρομπότ DARPA του Εθνικού Ινστιτούτου Προτύπων και Τεχνολογίας (NIST: National Institute of Standards and Technology) επιφορτίστηκε με την εύρεση μεθόδων για την αντικειμενική εξέταση και αξιολόγηση των ρομπότ που χρησιμοποιούνται σε επιχειρήσεις εντοπισμού και διάσωσης. Στα πλαίσια αυτού του προγράμματος διαμορφώθηκαν ειδικές αρένες για την πειραματική αξιολόγηση των ρομπότ. Οι αρένες αυτές είναι ειδικά σχεδιασμένες να προσομοιάζουν τις συνθήκες που διαμορφώνονται μετά την κατάρρευση ενός κτηρίου, και εμφανίζουν διαφορετικό βαθμό δυσκολίας. Την πρώτη τους “εμφάνιση”, έκαναν σε έναν από τους διαγωνισμούς για το καλύτερο ρομπότ διάσωσης στα πλαίσια ενός συνεδρίου Τεχνητής Νοημοσύνης, το 2000, στο Τέξας, από την Αμερικάνικη Εταιρία.



Σχήμα 1.4: Τα τρία ρομπότ που κέρδισαν βραβεία στο διαγωνισμό για το καλύτερο ρομπότ εντοπισμού και διάσωσης που πραγματοποιήθηκε το 2003 (α). Τσεχία (β) Ιράν (γ) Ιράν (Τα ρομπότ ήταν εξοπλισμένα με GPS, οπτικές κάμερες, μικρόφωνα, θερμόμετρα υπερύθρων)

Τα ρομπότ διάσωσης χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά, σε πραγματικές συνθήκες, μετά την καταστροφή του World Trade Center, την 11^η Σεπτεμβρίου του 2001. Οι κατηγορίες των ρομπότ που συμμετείχαν στον εντοπισμό περιλάμβαναν ρομπότ με καλώδιο και ασύρματα. Στην πρώτη κατηγορία, τα ρομπότ ήταν στο μέγεθος ενός κουτιού παπουτσιών, εφοδιασμένα με βίντεο κάμερα, προβολείς και διπλής διαδρομής ήχο. Ο χειρισμός τους και η τροφοδοσία γινόταν μέσω ενός καλωδίου 30 μέτρων. Λόγω του μικρού μεγέθους τους, τα ρομπότ ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικά κατά την είσοδό τους σε στενούς χώρους. Η διεξόδυσή τους κυμάνθηκε από 6-14 μέτρα σε αντίθεση με τις συμβατικές κάμερες που εισχωρούν γύρω στα 2 μέτρα. Τα ρομπότ αυτά κατάφεραν να εντοπίσουν τουλάχιστον 5 θύματα και να προσδιορίσουν, αν οι κενοί χώροι ήταν ασφαλείς για τον απεγκλωβισμό των θυμάτων ή αν απαιτείται απομάκρυνση των χαλασμάτων πριν συνεχιστεί ο παραπέρα έλεγχος.

Τα άλλα τέσσερα ρομπότ που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ασύρματα. Ένα από αυτά (Solem, της εταιρίας Foster-Miller) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση σε μεγαλύτερου μεγέθους κενούς χώρους στα ερείπια, ενώ τα υπόλοιπα τρία χρησιμοποιήθηκαν σαν επιβεβαίωση της ανίχνευσης των προηγούμενων ρομπότ στα κτήρια (εταιριών: Foster-Miller/ Talon, iRobot/ Packbot και SPAWAR/ Urbot). Τα τέσσερα αυτά μοντέλα ήταν στο μέγεθος μιας μικρής βαλίτσας εξοπλισμένα με βίντεο κάμερα, διπλής διαδρομής ήχο και αισθητήρες. Το μεγαλύτερο μέγεθος τους τα έκανε

κατάλληλα για την ανίχνευση σε λιγότερο κατεστραμμένα κτήρια. Τα ρομπότ αυτά δεν εντόπισαν κανένα θύμα.



Σχήμα 1.5: Το ρομπότ Packbot που χρησιμοποιήθηκε μετά την συντριβή στο World Trade Center

Ανεξάρτητα από τον βαθμό αυτοματισμού που εμφανίζουν τα ρομπότ που χρησιμοποιούνται στις επιχειρήσεις εντοπισμού και διάσωσης, πρέπει να λειτουργούν σαν τα μέλη μιας ομάδας στην οποία περιλαμβάνονται μαζί με αυτά οι διασωστικές ομάδες, οι εκπαιδευμένοι σκύλοι και ο υπόλοιπος τεχνολογικός εξοπλισμός. Οι διασώστες πρέπει να ενημερώνονται για τα ευρήματα των ρομπότ και τις περισσότερες φορές η αναγνώριση αντικειμένων και θυμάτων να είναι αποτέλεσμα συνεργασίας των δύο.

Η έρευνα και η ανάπτυξη στον πολλά υποσχόμενο τομέα των ρομπότ για αύξηση της αποτελεσματικότητας τους έγκειται στους πιο κάτω άξονες:

Βελτίωση του τηλεχειρισμού και της ανάπτυξης βασικών ικανοτήτων για ανάμικτες πρωτοβουλίες όπως αυτό της ανάκτησης χαμένης επικοινωνίας ρομπότ και χειριστή, εκτίμηση χρόνου για την ολοκλήρωση της αποστολής βασισμένο στην κατανάλωση ενέργειας και της απόστασης από την έξοδο.

Ανάπτυξη έξυπνης αντίληψης: υποστήριξη της παρακολούθησης των δεδομένων και πληροφοριών που προέρχονται και από άλλα ρομπότ.

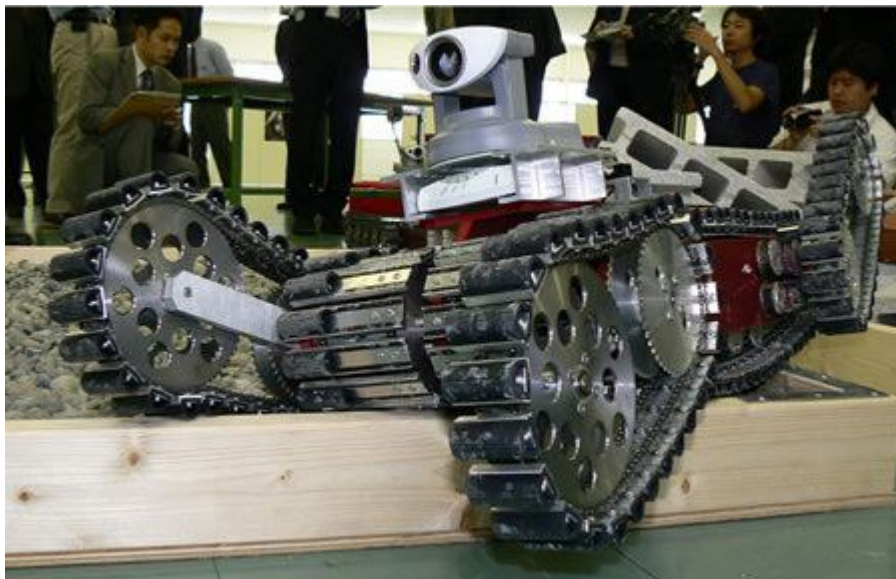
Βέλτιστη λειτουργία ακόμα και σε περιορισμένους χώρους με ακανόνιστα ερείπια και με μη ομογενή υλικά.

Εκτίμηση δομικής κατάστασης: η ικανότητα κατασκευής 3D μετρικών χαρτών, το ρομπότ έχει την ικανότητα να προσθέτει δεδομένα για τους όγκους που επιτρέπουν στον χειριστή να χαρακτηρίσει την δομή και να πάρει αποφάσεις για την εξαγωγή του θύματος.

Προσαρμογή στήριξης: σαν μια φυσική προέκταση της εκτίμησης των εργασιών τα ρομπότ επιλεκτικά ενισχύουν κρίσιμα σημεία στα πλαίσια των κενών χώρων των ερειπίων για την αποφυγή μεταγενέστερων μετασεισμών

Εκτίμηση της κατάστασης ενός θύματος: παρόλο που η πλοήγηση και ο εντοπισμός ενός θύματος έχουν αυτοματοποιηθεί η εκτίμηση της κατάστασης ενός εγκλωβισμένου είναι ακόμα συνεργιστική διαδικασία.

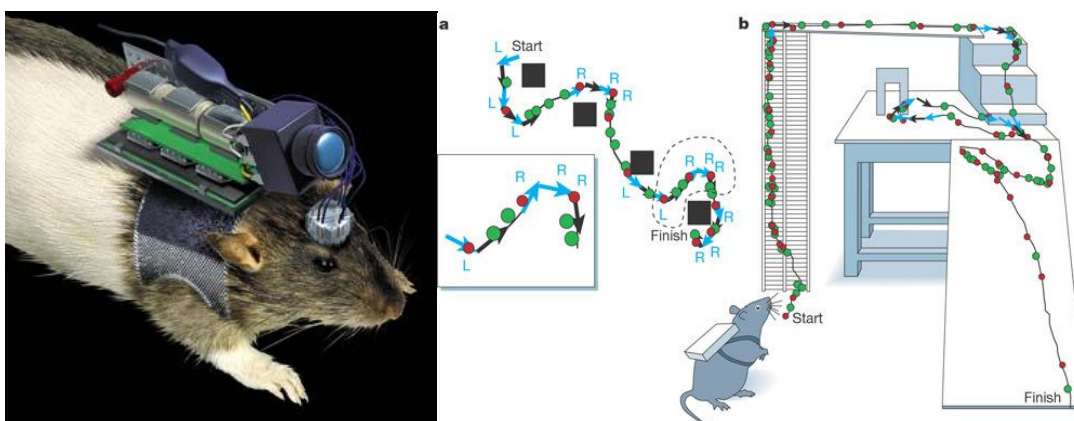
Τέλος η βοήθεια του παγιδευμένου θύματος: ιατρικές τεχνολογίες με το δυναμικό της τηλεϊατρικής π.χ. χορήγηση φαρμάκων κ.α.



Σχήμα 1.6: Πρόσφατα εμφανιζόμενο ρομπότ εξειδικευμένο για επιχειρήσεις εντοπισμού και διάσωσης από το ινστιτούτο Chiba της Ιαπωνίας. Εξοπλισμένο με κάμερα IR για θερμική ανίχνευση των εγκλωβισμένων, ταχύτητα 1,1 m/sec, βάρος 22,5 kg και κόστος 26.800 \$.

1.7.2 Ποντίκια Ρομπότ (Roborat)

Τον Μάιο του 2002, στο περιοδικό Nature παρουσιάστηκε μια μελέτη για την ελεγχόμενη καθοδήγηση ποντικών από απόσταση. Στο άρθρο αυτό, επιστήμονες εμφύτευσαν ηλεκτρόδια σε σημεία του εμπρόσθιου τμήματος του εγκεφάλου ποντικών και του τμήματος του φλοιού που σχετίζεται με τις σωματικές αισθήσεις τους. Με την χρήση ενός υπολογιστή διοχέτευαν μικρό παλμούς για τον ερεθισμό αυτών των σημείων του εγκεφάλου επιτυγχάνοντας με αυτό τον τρόπο την καθοδήγηση των ποντικών. Μια από τις απόψεις των ερευνητών στο άρθρο αυτό ήταν πως τα ποντίκια μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις επιχειρήσεις εντοπισμού εγκλωβισμένων. Τελικό σχόλιο του άρθρου, ήταν ότι τα καθοδηγούμενα ποντίκια μπορούν να λειτουργήσουν τόσο σαν κινητά ρομπότ όσο και σαν βιολογικοί αισθητήρες (roborat).



Σχήμα 1.7: Παραδείγματα πλοήγησης ποντικών με μικροερεθισμό του εγκεφάλου [Talwar et al. 2002]

Ωστόσο η χρήση τους, στον εντοπισμό και την διάσωση των εγκλωβισμένων φαίνεται, τουλάχιστον για την ώρα, να απέχει από την εφαρμογή τους σε πραγματικές συνθήκες. Τα μειονεκτήματα που εμφανίζουν και τα κάνουν λιγότερο ανταγωνιστικά σε σχέση με τα ρομπότ, αφορούν τα πιο κάτω θέματα:

Οι πληροφορίες που πρέπει να έχει η διασωστική ομάδα μετά από κάποιο περιστατικό, περιλαμβάνουν εκτός από την κατάσταση του εγκλωβισμένου που μεταφράζεται σε κάμερες, διπλής διαδρομής ήχο και ανιχνευτές αερίων στον απαραίτητο εξοπλισμό και τη δομή του κενού χώρου για την ασφαλή εξαγωγή των εγκλωβισμένων που σημαίνει μετρικούς χάρτες και επομένως αισθητήρες δομής χώρου. Η χρήση λοιπόν ενός ποντικιού ικανού να κουβαλάει πολλαπλάσια του βάρους του για αρκετό χρονικό διάστημα φαίνεται τουλάχιστον για την ώρα, αδύνατο.

Επιπλέον, ο χρόνος εργασίας των ποντικιών όπως προσδιορίζεται από την μελέτη κυμαίνεται κατά μέσο όρο στην μια ώρα κάτι που δεν είναι ιδιαίτερα πρακτικό για τις επιχειρήσεις εντοπισμού και διάσωσης.

Τέλος, από ηθικής πλευράς, η χρήση ποντικιών για την ανίχνευση και τον εντοπισμό εγκλωβισμένων που είναι τραυματισμένοι και τρομαγμένοι για την ίδια τους την ζωή μπορεί να οδηγήσει σε επικίνδυνες για τους εγκλωβισμένους καταστάσεις όπως αυτές του πανικού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ-ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Περισσότερα από 21.000 άτομα σκοτώθηκαν το 2001 σε ολόκληρο τον κόσμο από τους σεισμούς, απολογισμός ιδιαίτερα βαρύς για μία χρονιά, την οποία οι επιστήμονες χαρακτηρίζουν «φυσιολογική» από πλευράς σεισμικής δραστηριότητας. Σύμφωνα με το Γεωλογικό Παρατηρητήριο των ΗΠΑ (USGS), το 2001 σημειώθηκαν 65 «σημαντικοί» σεισμοί σε ολόκληρο τον πλανήτη, έναντι 82 που σημειώθηκαν το 2000 (> 6.5 βαθμών της κλίμακας Ρίχτερ) [www.usgs.gov].

Το ανθρώπινο κόστος υπήρξε αρκετά μεγάλο και η ανάγκη για μια πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση του φαινομένου κρίνεται απαραίτητη. Ο εντοπισμός και η διάσωση εγκλωβισμένων κάτω από ερείπια γκρεμισμένων κτιρίων θεωρείται ο σημαντικότερος στόχος των διασωστικών ομάδων. Η διασωστική προσπάθεια όμως αποτελεί ένα αντικείμενο στο οποίο έχει γίνει κυρίως επιχειρησιακή έρευνα και ελάχιστη, αν όχι καθόλου, συστηματική επιστημονική έρευνα.

Η ανάπτυξη ωστόσο μεθόδων εντοπισμού και η βελτίωση των ήδη υπαρχόντων (γαιόφωνα, κάμερες, εκπαιδευμένοι σκύλοι) απαιτεί έρευνα τόσο σε επιχειρησιακό όσο και σε επιστημονικό επίπεδο. Η νέα χημική μέθοδος εντοπισμού εγκλωβισμένων σε κτίρια που έχουν καταρρεύσει μετά από σεισμό έρχεται να ενισχύσει και να συνδυάσει τις πιο πάνω ήδη υπάρχουσες τεχνικές και να εισαγάγει μια εντελώς καινούργια μεθοδολογία, *τη χημική ανάλυση*, μειώνοντας έτσι ουσιαστικά το χρόνο αναζήτησης στα ερείπια αλλά και εστιάζοντας-κατευθύνοντας την αναζήτηση αυτή.

Προκειμένου λοιπόν να αναπτυχθεί η νέα αυτή μέθοδος εντοπισμού είναι αναγκαίο να μελετηθούν τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πειραματικό επίπεδο οι χαρακτηριστικές πτητικές ουσίες των ανθρώπινων εκκρίσεων και της σύστασης του εκπνεόμενου αέρα.

Μια πρώτη διάκριση των ουσιών αυτών είναι σε ανόργανες (αμμωνία, διοξείδιο του άνθρακα, ύδωρ) και οργανικές ενώσεις (αιθανόλη, ακετόνη, ισοπρένιο κ.λ.π.) Παρατέρα οι ουσίες αυτές μπορούν να διαχωριστούν με βάση το μοριακό τους βάρος. Έτσι διακρίνουμε ουσίες μεγάλου και μικρού μοριακού βάρους. Μεταξύ των ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ορμόνες, οι οποίες όμως εκκρίνονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και χαρακτηρίζονται από χαμηλή πτητικότητα. Μια ειδική κατηγορία ενώσεων με έντονο ιατρικό ενδιαφέρον είναι οι φερομόνες, ουσίες που έχουν την δυνατότητα να αλλάζουν την ανθρώπινη συμπεριφορά.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ουσιών αυτών αποτελεί ένα καίριο σημείο αναφοράς και εξετάζεται μιας και αποτελεί τον κατ' εξοχήν παράγοντα για την ανίχνευση τους. Αξίζει να σημειωθεί πως τα όρια τις χημικής ανάλυσης έχουν μειωθεί εντυπωσιακά και πλέον οι αναλύσεις πραγματοποιούνται στο επίπεδο των ppt (parts per trillion). Από επιχειρησιακής σκοπιάς, οι ουσίες αυτές παράγονται σημειακά με ένα ρυθμό που εξαρτάται από τις συνθήκες εγκλωβισμού και διασπείρονται στο χώρο με διάχυση ή με μεταφορά. Οι ποσότητες τους έτσι παρουσιάζουν μια διακύμανση στο χώρο.

Το θέμα λοιπόν του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού των ουσιών αυτών, αποτελεί αντικείμενο σημειακής ανάλυσης και πρέπει να αναλυθεί από την μεριά της

χωροχρονικής κατανομής, για την οποία δεν έχουν πραγματοποιηθεί προηγούμενες μελέτες.

Γίνεται λοιπόν φανερό, πως η ανάγκη για καταγραφή και συστηματοποίηση όλων των παραμέτρων που σχετίζονται με την νέα αυτή χημική μέθοδο εντοπισμού, είναι επιτακτική. Ο καθορισμός δε των σκοπών κρίνεται αναγκαίος για την ομαλή και χωρίς αποπροσανατολισμούς εξέλιξη της έρευνας που πραγματοποιείται.

2.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Το σύνολο των πτητικών ουσιών που εκκρίνει ο ανθρώπινος οργανισμός είναι αποτέλεσμα διαφόρων πηγών όπως: φαγητά, πρόσθετα τροφών, μόλυνση του αέρα, βακτηριακές ζυμώσεις στο έντερο και από διάφορες άλλες μεταβολικές διαδικασίες του σώματος. Στα ούρα και στο πλάσμα ενδεικτικά αναφέρεται πως έχουν βρεθεί αλκοόλες, αλδεύδες, φουράνια, κετόνες, τερπένια και άλλα ετεροκυκλικά συστατικά [Mills A.G. et al. 2001a].

Δεκάδες ερευνητικές ομάδες έχουν προσπαθήσει να συσχετίσουν για ιατρικούς σκοπούς τις εκπομπές των πτητικών συστατικών με φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις για εκτέλεση κυρίως αναίμακτων ιατρικών εξετάσεων και για τη μελέτη των μεταβολικών οδών του ανθρώπινου οργανισμού. Θα πρέπει να τονιστεί όμως, ότι στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν στοιχεία, που να αφορούν αναλύσεις για τον εντοπισμό εγκλωβισμένων σε κτίρια που έχουν καταρρεύσει μετά από σεισμό.

Τα ούρα προτιμώνται συνήθως από τα βιολογικά υγρά, μιας και τα συστατικά τους πριν από την έκκριση τους, συγκεντρώνονται στο νεφρό. Το προφίλ των ούρων είναι πολύ πιο δύσκολο για τα πτητικά συστατικά λόγω της μεγάλης πτητικότητας τους, της ποικίλης δομής των συστατικών τους αλλά και λόγω των διαφορών στην πολικότητα και τη συγκέντρωσή τους. Καλύτερο διαχωρισμό των συστατικών των ούρων προσφέρουν οι τριχοειδείς χρωματογραφικές στήλες (GC), σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας (MS) [Mills A.G. et al. 2001]. Στο προφίλ των VOCs των ούρων συνυπάρχουν δηλ. πολλές ομάδες συστατικών διαφορετικής πολικότητας: αλκοόλες, κετόνες, O- και N- ετεροκυκλικές ενώσεις, ενώσεις που περιέχουν θείο (σουλφίδια, ισοκυανικά, μερκαπτάνες) αλλά και υδρογονάνθρακες [Wahl G.H. et al. 1999].

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί ένα έντονο ιατρικό ενδιαφέρον για την καταγραφή και την αξιολόγηση των ουσιών που εκπέμπει η ανθρώπινη αναπνοή. Εκατοντάδες ουσίες έχουν προσδιοριστεί ότι εκπέμπονται από φυσιολογικά υγιή άτομα, με τη βοήθεια της φασματομετρίας μάζας και της αέριας χρωματογραφίας. Αυτές οι πτητικές οργανικές ουσίες (VOCs) προέρχονται από διάφορες μεταβολικές διεργασίες αλλά και από τη ροή του αίματος από την πνευμονική κυψελιδική μεμβράνη στο κυψελιδικό αέρα (με παθητική διάχυση). Αυτό υποδηλώνει ότι οι συγκεντρώσεις των VOCs της εκπνοής σχετίζονται με τις αντίστοιχες στο αίμα. Η αύξηση ή μείωση των συγκεντρώσεων κάποιων ουσιών της ανθρώπινης εκπνοής έχει αξιολογηθεί και χρησιμοποιηθεί ιατρικά σαν διαγνωστικό εργαλείο για διάφορες ασθένειες και αλλαγές στον μεταβολισμό. Η συλλογή του δείγματος είναι εύκολη, δεν είναι επίπονη και προτιμάται έναντι της δειγματοληψίας αίματος και ούρων. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι οι πτητικοί υδρογονάνθρακες, *αιθάνιο και πεντάνιο*, χρησιμοποιούνται σαν δείκτες (**markers**) της υπεροξειδωσής των λιπιδίων και της οξειδωτικής αποικοδόμησης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Άλλες πτητικές οργανικές ουσίες έχουν συνδεθεί με τον καρκίνο των πνευμόνων, με ηπατικές νόσους

και με μυοκαρδιακά εμφράγματα. Αυξημένη συγκέντρωση *ακετόνης* (50 nmol/L) έχει βρεθεί σε ανθρώπους που πάσχουν από διαβήτη, μια ασθένεια στην οποία είτε το πάγκρεας εμφανίζει μειωμένη παραγωγή ινσουλίνης, είτε τα κύτταρα του οργανισμού αδυνατούν να χρησιμοποιήσουν την ινσουλίνη. Επιπλέον, η *ακετόνη* έχει συσχετιστεί με την παρακολούθηση ασθενών που βρίσκονται σε δίαιτα. Παράλληλα, μπορεί να παρακολουθηθεί και να αξιολογηθεί η έκθεση εργαζομένων στους περιβαλλοντικούς ρύπους που υπάρχουν στο χώρο εργασίας τους. Ένας συνήθης έλεγχος τέλος, αποτελεί ο προσδιορισμός της *αιθανόλης* στο αίμα, μια και η συγκέντρωση της ουσίας αυτής στην εκπνοή σχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση της στο αίμα. Έχει προσδιοριστεί ότι ισχύει η αναλογία *εκπνοή / αίμα* = 1:2100 και βάση αυτής της σχέσης λειτουργούν οι διάφορες συσκευές ανάλυσης εκπνεόμενης αλκοόλης [Grote C. et al. 1997]

Οι ουσίες αυτές της εκπνοής όμως είναι παρούσες σε πολύ μικρές ποσότητες (\leq nanomolar). Προκειμένου λοιπόν να αυξηθεί η ευαισθησία και η ποιότητα του δείγματος, το δείγμα πρέπει να συγκεντρωθεί πρώτα, πριν αναλυθεί. Οι τρεις λοιπόν πιο κοινά αποδεκτές χρησιμοποιούμενες μέθοδοι προσυγκέντρωσης του δείγματος είναι η χημική αλληλεπίδραση, η προσρόφηση και η κρυοπαγίδευση [Grote C. et al. 1997, Phillips M. 1997]

2.2.1 Εκπνεόμενος Αέρας

Η επιστημονική ανάλυση της εκπνοής ξεκίνησε το 1784 με τον A. Lavoisier, τον πατέρα της μοντέρνας χημείας, που παρουσίασε ότι το διοξείδιο του άνθρακα εκκρίνεται από την εκπνοή ινδικών χοιριδίων. Αυτό αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη ότι ο μεταβολισμός των τροφίμων είναι ανάλογος με την κατανάλωση των καυσίμων, μια ανακάλυψη που τοποθέτησε την βάση για την σύγχρονη βιοχημεία. Οι χρωματογραφικές τεχνικές που αναπτύχθηκαν αργότερα κατά την διάρκεια του 19^{ου} αιώνα έκαναν δυνατή την ανίχνευση πλέον και των πτητικών οργανικών ενώσεων που εμφανίζονται στην εκπνοή σε συγκεντρώσεις της τάξεως των mmol, 10^{-3} M.

Η πρώτη ανάλυση εκπνοής, αφορούσε τον προσδιορισμό της *αιθανόλης* σε αυτήν (είναι ακόμα η πιο δημοφιλής εφαρμογή στην ανάλυση εκπνοής) κι αναπτύχθηκε από τον Βρετανό ιατρό Francis Anstie το 1874. Ο Anstie, βρήκε πως όταν ο εκπνεόμενος αέρας που διοχέτευε μέσα από διάλυμα χρωμικού οξέος άλλαζε το χρώμα του διαλύματος από καστανέρυθρο σε πράσινο, αυτό οφειλόταν στην ύπαρξη *αιθανόλης* στην εκπνοή. Ο Nebelthau στην Γερμανία, χρησιμοποίησε ανάλογα την αλλαγή στο χρώμα ενός αλκαλικού ιωδιούχου διαλύματος, προκειμένου να αποδείξει την παρουσία της *ακετόνης* στην εκπνοή των διαβητικών. Ωστόσο, η σύγχρονη περιοχή στην ανάλυση της εκπνοής, δεν είχε ξεκινήσει πριν το 1971, όπου ο βραβευμένος με Νομπέλ Linus Pauling ασχολήθηκε με το πρόβλημα αυτό. Ο Pauling χρησιμοποιώντας μια κρύο-παγίδα, έναν σωλήνα δηλαδή που ψυχόταν με ξηρό πάγο κατάφερε να επιτύχει αρχικά, την παγίδευση των VOCs της εκπνοής. Στην συνέχεια θερμαίνοντας τον σωλήνα, εισήγαγε το δείγμα σε έναν αέριο χρωματογράφο και βρήκε ότι η ανθρώπινη εκπνοή περιείχε χιλιάδες διαφορετικά VOCs, τα περισσότερα από τα οποία βρίσκονται σε συγκεντρώσεις της τάξης των pmol (10^{-12} M).

Σήμερα γνωρίζουμε πως το μεγαλύτερο μέρος της εκπνοής είναι ένα μίγμα που αποτελείται από διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), οξυγόνο (O₂), άζωτο (N₂), ύδωρ και άλλα εσωτερικά αέρια όπως (NO). Στην πραγματικότητα, το μοτίβο της ανθρώπινης εκπνοής συμπληρώνει ένα μικρό κλάσμα αποτελούμενο από τις πτητικές οργανικές

ενώσεις (VOCs), που σε επίπεδο συγκεντρώσεων κυμαίνονται μεταξύ nmol/l- μ mol/l (ppbv-ppbv). Η μελέτη των οποίων αποτελεί το αντικείμενο πρωτότυπης έρευνας της τελευταίας εικοσαετίας. Όσον αφορά την ανθρώπινη εκπνοή θα πρέπει τέλος να σημειωθεί πως στο συμπύκνωμα αυτής, έχουν προσδιοριστεί επίσης μη-πτητικές ενώσεις όπως ισοπροστάνες, κυτοκίνες, λευκοτριένια καθώς και υπεροξειδίο του υδρογόνου [Montuschi P. et al. 2002].

Ο αριθμός των VOCs στην ανθρώπινη εκπνοή είναι σημαντικά μεγάλος. Τα περισσότερα δείγματα εκπνοής περιέχουν περισσότερα από 200 VOCs, ενώ υπάρχουν σχεδόν 3000 VOCs που έχουν ανιχνευθεί τουλάχιστον μια φορά στην ανθρώπινη εκπνοή [Phillips M. et al. 1999a,b, Tenshima N. et al. 2005].

Η πηγή και η φυσιολογική λειτουργία των περισσότερων VOCs είναι ωστόσο άγνωστη. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα συγκεκριμένα μεταβολικά μονοπάτια που προκαλούν αύξηση στα ποσοστά εμφάνισή τους στην εκπνοή είναι ακόμα άγνωστα. Μερικά VOCs στον εκπνεόμενο αέρα προέρχονται από το περιβάλλον, λόγω του ότι απορροφούνται από το δέρμα ή προσλαμβάνονται μέσω της αναπνοής ή της κατανάλωσης τους από τα τρόφιμα. Οι ενώσεις αυτές μεταβολίζονται πιθανώς στον οργανισμό και μετά απεκκρίνονται από την εκπνοή. Άλλες πτητικές ενώσεις παράγονται από τον ανθρώπινο οργανισμό σαν προϊόντα των μεταβολικών διαδικασιών ή τις δραστηριότητας των βακτηρίων του εντέρου.

Οι κυριότεροι παράγοντες που επιδρούν στην μεγάλη μεταβλητότητα της σύστασης της ανθρώπινης εκπνοής περιλαμβάνουν την φυσική κατάσταση και γενικότερα την υγεία του υποκειμένου, την διατροφή, τις περιβαλλοντικές επιρροές και το γενικότερο τρόπο ζωής.

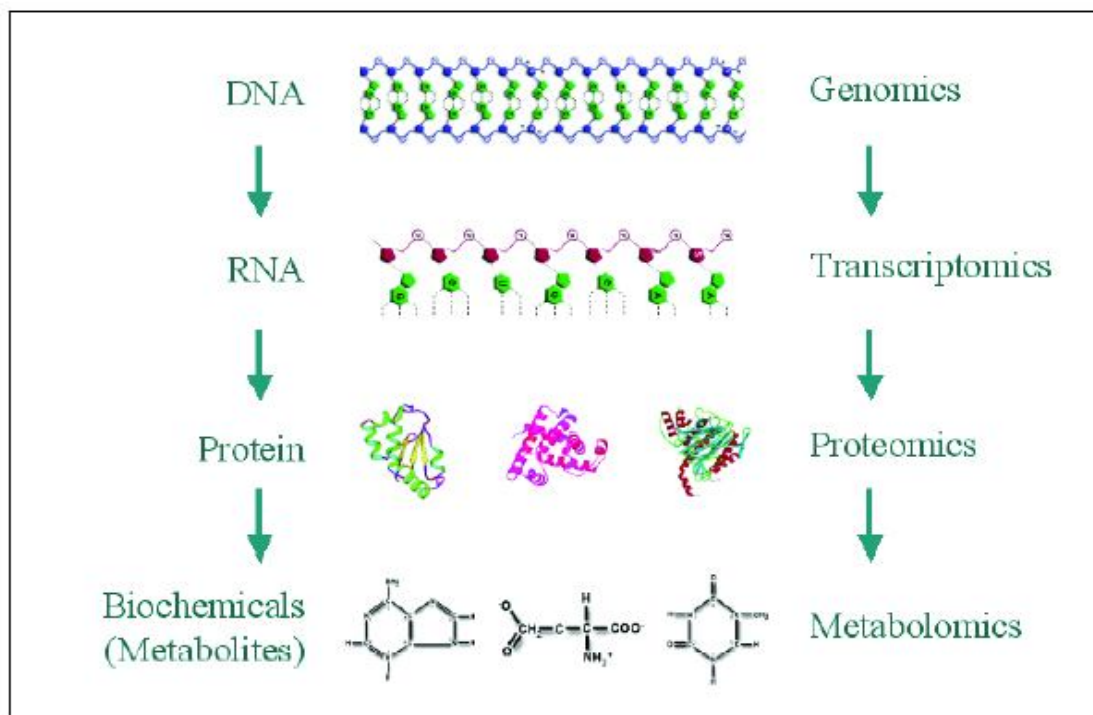
2.3 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ

Η κατανόηση των βιοχημικών μονοπατιών που αποτελούν το σύνολο του ανθρώπινου μεταβολισμού είναι ένα από τα μεγαλύτερα επιτεύγματα της έρευνας των βιολογικών επιστημών τα τελευταία 100 χρόνια. Η σχολαστική και ανατρεπτική έρευνα τεσσάρων γενεών καθιέρωσε όχι μόνο τα κυριότερα μεταβολικά μονοπάτια αλλά και τους παράγοντες που επηρεάζουν τις μεταβολές σε αυτά. Η γνώση αυτή υπήρξε η βάση για την βελτίωση της υγείας των ανθρώπων του 20^{ου} αιώνα. Η σημερινή πρόκληση στον τομέα της βιοχημείας έχει να κάνει με το πρόβλημα του μη-ισορροπημένου μεταβολισμού. Προκειμένου να διατηρηθεί η καλή υγεία των ανθρώπων, πρέπει όλα τα μεταβολικά τους μονοπάτια να λειτουργούν καλά και οι μεταβολικές ανάγκες να είναι ισορροπημένες από τις διατροφικές εισροές. Όλο και περισσότεροι άνθρωποι εμφανίζουν ασθένειες λόγω μη ισορροπημένου μεταβολισμού όπως η αθηροσκλήρυνση, η παχυσαρκία, ο διαβήτης, η υπέρταση και η οστεοπόρωση [Alberti G. 2001]. Παρόλο που στις ασθένειες του μεταβολισμού γίνεται σύνδεση τους συνήθως με τον χαρακτηριστικό μεταβολίτη τους (π.χ. ο διαβήτης με την γλυκόζη, η καρδιαγγειακές ασθένειες με την χοληστερόλη), τα μεταβολικά μονοπάτια δεν υφίστανται σαν απομονωμένα συστήματα. Αντίθετα είναι κομμάτια ενός συνόλου που αποτελεί τον ανθρώπινο μεταβολισμό. Η αριστοποίηση του μεταβολισμού σαν ένα σύνολο, προκειμένου να αποφευχθεί η χρόνια αποσταθεροποίηση του είναι το πρόβλημα που έχουν να αντιμετωπίσουν οι επιστήμονες του χώρου αυτού. Η ανάπτυξη ωστόσο των αναλυτικών τεχνολογιών και η βελτίωση τους στο σημείο που οι αρκετοί μεταβολίτες μπορούν να μετρηθούν ταυτόχρονα, σε συνδυασμό με υπολογιστικές τεχνολογίες αποτελούν τον ανερχόμενο

πεδίο της μεταβολομικής (metabolomics) που αναπτύχθηκε για να εξετάζει τον μεταβολισμό πλέον ενιαία για τους προαναφερθέντες λόγους.

Η μεταβολομική ανήκει στις πιο πρόσφατα εισαχθείσες –ομικές τεχνικές και αφορά την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των σχετικών συγκεντρώσεων των μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος (οργανισμού) [Feihl O. 2002]. Το ανερχόμενο πεδίο της μεταβολομικής ανιχνεύει ή/και ποσοτικοποιεί τα μικρού μοριακού βάρους μόρια, γνωστά ως μεταβολίτες που παράγονται από ενεργά κύτταρα κάτω από διαφορετικές συνθήκες και χρόνους στο κύκλο ζωής τους [Daviss E. 2005]. Θα λέγαμε λοιπόν πως μεταβολομική είναι η «συστηματική μελέτη των μοναδικών χημικών αποτυπωμάτων που αφήνουν πίσω τους οι διάφορες κυτταρικές διεργασίες ενός οργανισμού».

Η μεταβολομική είναι το τελευταίο άκρο στην διάταξη των –ομικών τεχνικών και εκείνη που βρίσκεται πιο κοντά στον φαινότυπο [Weckwerth W. 2003]. Όπως φαίνεται στο Σχ. 2.1 σύμφωνα με το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας, το DNA μεταγράφεται σε RNA, το οποίο εν συνεχεία μεταφράζεται σε πρωτεΐνες. Παρόλο που ο ακριβής αριθμός δεν έχει προσδιοριστεί επακριβώς, φαίνεται να υπάρχουν 37.000-40.000 γονίδια. Τα γονίδια αυτά μεταγράφονται σε μόρια RNA, τα οποία ακολούθως εκτιμάται ότι είναι 125.000-250.000. Τα μόρια RNA μεταφράζονται σε πρωτεΐνες που υπολογίζονται γύρω στο 1.000.000. Κατά μια έννοια κάποιος μπορεί να πει πως το DNA είναι μια μορφή κωδικοποιημένης και συμπιεσμένης πληροφορίας με ανάλογο τρόπο όπως συμβαίνει με τα αρχεία του υπολογιστή. Το μεταβόλωμα (metabolome) αντιπροσωπεύει την συλλογή όλων των μεταβολιτών σε έναν βιολογικό οργανισμό, που είναι τα τελικά προϊόντα της έκφρασης των γονιδίων. Έτσι ενώ τα δεδομένα της γονιδιομικής (genomics) έκφρασης του RNA και η πρωτεομική (proteomics) ανάλυση δεν περιγράφουν όλη την κατάσταση του τι μπορεί να συμβαίνει σε ένα κύτταρο, το μεταβολικό προφίλ μπορεί να προσφέρει μια άμεση ματιά στην φυσιολογία του κυττάρου. Μια από τις προκλήσεις των βιολογικών συστημάτων είναι η ενοποίηση όλων των –ομικών τεχνικών προκειμένου να δοθεί μια ολοκληρωμένη εικόνα των ζώντων οργανισμών.



Σχήμα 2.1: Διάταξη –ομικών τεχνικών (Γονιδιομική, Μεταγραφομική, Πρωτεομική, Μεταβολομική)

2.3.1 Ιστορική Αναδρομή

Η αρχή της μεταβολομικής τοποθετείται στο 2000-1500 π.Χ όταν οι παραδοσιακοί Κινέζοι γιατροί της εποχής χρησιμοποιούσαν έντομα προκειμένου να αξιολογήσουν τα ούρα των ασθενών για τον προσδιορισμό υψηλών επιπέδων γλυκόζης σε αυτά. Τα ούρα ήταν επίσης ένα μέσο για τον προσδιορισμό του διαβήτη στην Αρχαία Αίγυπτο, που γινόταν αντιληπτός λόγω της συχνής ούρησης του ασθενή (πολυουρία). Αυτή η πρώιμη χρήση των βιολογικών υγρών για τον καθορισμό της βιολογικής κατάστασης μπορεί να θεωρηθεί σαν την πρώτη χρήση της μεταβολομικής.

Οι χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού που έκαναν την αρχική ανίχνευση των μεταβολιτών δυνατή αναπτύχθηκαν στα τέλη του 1960, χρονολογία που ορίζει την τεχνική προέλευση του πεδίου.

Η μεταβολομική ξεκίνησε να αναπτύσσεται το 1970 από τον Arthur Robinson που εξετάζοντας τις ιδέες του βραβευμένου με Νόμπελ Linus Pauling για το αν η βιολογική διακύμανση μπορεί να εξηγηθεί στην βάση των διατροφικών απαιτήσεων. Αναλύοντας τα χρωματογραφήματα ούρων από υποκείμενα που είχαν προσλάβει βιταμίνη B-6 ο Robinson συνειδητοποίησε πως η σύσταση των χημικών ουσιών που περιέχονται στα ούρα περιείχε σημαντικές πληροφορίες.

Παρόλο που μέχρι εκείνη την εποχή δεν λεγόταν μεταβολομική η πρώτη δημοσίευση σε αυτό το πεδίο είχε τον τίτλο «Quantitative Analysis of Urine Vapor and Breath by Gas-Liquid Partition Chromatography» από τον Robinson και τον Pauling το 1971 και δημοσιεύθηκε στο *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Έκτοτε ο Robinson είχε 19 ακόμα δημοσιεύσεις στην μέτρηση του προφίλ των μεταβολιτών σε διάφορα βιολογικά υγρά.

Η βασική ιδέα του Robinson ήταν, ότι τα πλούσια σε πληροφορία δεδομένα που αντανακλούν τη λειτουργική υπόσταση ενός περίπλοκου βιολογικού συστήματος ανήκουν στην ποσοτική και ποιοτική δομή των μεταβολιτών στα βιολογικά υγρά. Είκοσι χρόνια αργότερα κι άλλοι επιστήμονες άρχισαν να αναγνωρίζουν την αξία μιας τέτοιας προσέγγισης και το ενδιαφέρον στον τομέα αυτό ξεκίνησε να αναπτύσσεται σαν μανιτάρι. Ο όρος μεταβολομική επινοήθηκε στην δεκαετία του 1990 (το πρώτο άρθρο που χρησιμοποίησε τον όρο *metabolome* είχε τίτλο “Systematic functional analysis of the yeast genome” [Oliver S.G et al 1998] ενώ το 2004 δημιουργήθηκε μια κοινότητα, αναφερόμενη ως, *Metabolomics Society* (www.metabolomicsociety.org) με σκοπό την προαγωγή και ανάπτυξη του πεδίου έρευνας της μεταβολομικής.

Τον Ιανουάριο του 2007 επιστήμονες του πανεπιστημίου της Alberta και του πανεπιστημίου του Calgary συμπλήρωσαν την πρώτη έκδοση του ανθρώπινου μεταβολώματος. Καταχώρισαν και χαρακτήρισαν 2.500 μεταβολίτες. 1.200 φάρμακα και 3.500 συστατικά των τροφών τα οποία μπορούν να βρεθούν στον ανθρώπινο οργανισμό. Η βάση αυτή των δεδομένων της ανθρώπινης μεταβολομικής, η όπως περιγράφεται με τα αρχικά HMDB (Human Metabolome DataBase) είναι μια δωρεάν ηλεκτρονική βάση δεδομένων που περιέχει λεπτομερές πληροφορίες σχετικά με τα μικρά μόρια των μεταβολιτών που υπάρχουν στο ανθρώπινο σώμα. Σκοπό έχει να χρησιμοποιηθεί για εφαρμογές στην μεταβολομική την κλινική χημεία στην ανακάλυψη νέων βιο-δεικτών και στην γενική εκπαίδευση. Η βάση είναι σχεδιασμένη να περιέχει ή να συνδέει τρία είδη δεδομένων: **1) χημικά δεδομένα** **2) κλινικά δεδομένα** και **3) μοριακής βιολογίας/ βιοχημικά δεδομένα**. Η βάση δεδομένων περιέχει σχεδόν 2.500 καταχωρίσεις μεταβολιτών συμπεριλαμβανομένου αμφοτέρους υδατοδιαλυτούς και λιποδιαλυτούς μεταβολίτες καθώς επίσης και μεταβολίτες που μπορεί να θεωρηθούν σαν άφθονοι (>1μM) ή σχετικά σπάνιοι (<1nM). Επιπροσθέτως σχεδόν 5500 αλληλουχίες πρωτεϊνών (και DNA) συνδέονται με τις εισαγωγές των μεταβολιτών. Κάθε ΜεταβοΚάρτα περιέχει περισσότερες από 90 πεδία δεδομένων με τα μισά από αυτά να αφορούν πληροφορίες που είναι αφιερωμένες σε χημικά/κλινικά δεδομένα και τα άλλα μισά σε ενζυματικά και βιοχημικά δεδομένα. Πολλά πεδία δεδομένων έχουν υπερσύνδεση με άλλες βάσεις δεδομένων (**KKEGG**, **PubChem**, **MetaCyc**, **ChEBI**, **PDB**, **Swiss-Prot** και **GenBank**). Δυο επιπλέον βάσεις δεδομένων DrugBank και FooDB είναι επίσης κομμάτι της HMDB. Η DrugBank περιέχει πληροφορίες για 1500 φάρμακα ενώ η FooDB περιέχει πληροφορίες για 3500 συστατικά και πρόσθετα τροφών

Η μεταβολομική της σημερινής εποχής κουβαλάει στους ώμους της την ευθύνη για την λεπτομερή παροχή της περιγραφής των ανθρώπινων μονοπατιών και της λειτουργίας τους.

2.3.2 Στρατηγικές Εφαρμογής Μεταβολομικής

Το μεταβόλωμα αντιπροσωπεύει έναν τεράστιο αριθμό ουσιών, που εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία στις κατηγορίες ενώσεων που ανήκουν, όπως αμινοξέα, λιπίδια, οργανικά οξέα, νουκλεοτίδια κ.α. Οι ενώσεις αυτές διαφέρουν τόσο στις φυσικές αλλά και στις χημικές τους ιδιότητες. Το εύρος των συγκεντρώσεων τους επίσης είναι ιδιαίτερα μεγάλο. Σύμφωνα με εκτιμήσεις περισσότεροι από 2.000 μεταβολίτες υπάρχουν στον ανθρώπινο οργανισμό [Beecher et al. 2003]. Ο αριθμός αυτός φυσικά είναι ρευστός. Στο φυτικό βασίλειο, για παράδειγμα, έχουν υπολογιστεί 200.000 μεταβολίτες.

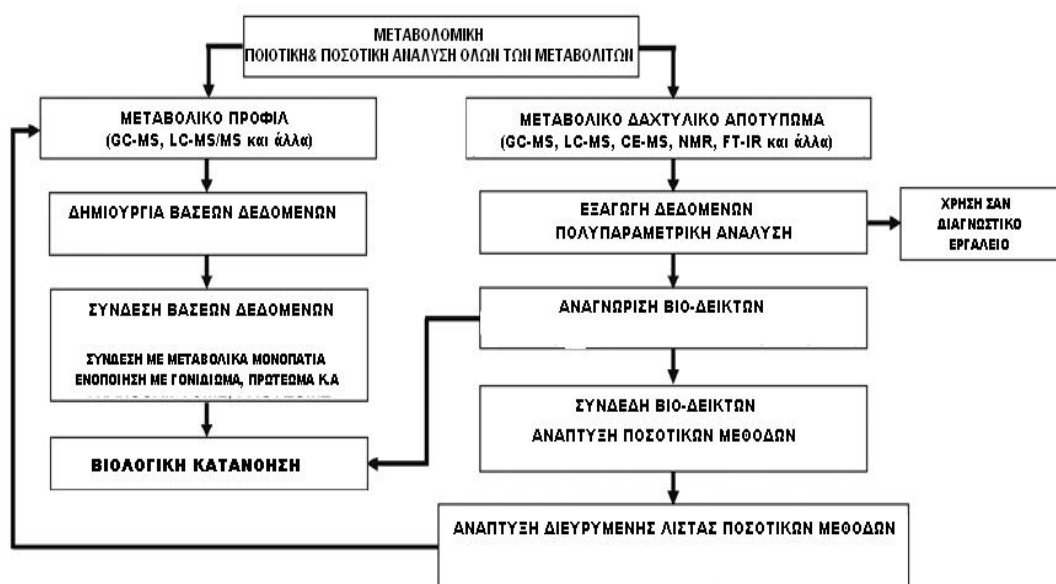
Οι προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται σήμερα για την εφαρμογή της μεταβολομικής είναι δύο και αλληλοσυμπληρούμενες. Η μελέτη του μεταβολικού προφίλ (metabolic profiling) και η μελέτη του μεταβολικού δαχτυλικού αποτυπώματος (metabolic fingerprinting) [Dettmer K. et al. 2004].

Η προσέγγιση με βάση το μεταβολικό προφίλ εστιάζεται στην ποσοτική κυρίως ανάλυση μιας ομάδας μεταβολιτών που είτε αυτή σχετίζεται με ένα συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι είτε αποτελεί μια συγκεκριμένη κατηγορία ενώσεων (π.χ. οργανικά οξέα).

Έναν πιο άμεσο τρόπο, στην χρήση της προσέγγισης αυτής, αποτελεί η ποσοτική ανάλυση συγκεκριμένων ουσιών “στόχων”. Σκοπός σε αυτή την περίπτωση είναι ο προσδιορισμός ενώσεων δείκτες (βιο-δείκτες, biomarkers) μιας ασθένειας ή της έκθεσης σε μια τοξική ένωση [Fiehn O. 2002].

Η προσέγγιση αυτή παράγει ανεξάρτητες πληροφορίες που μπορούν να ερμηνευθούν με όρους γνωστών μεταβολικών μονοπατιών και φυσιολογικών αλληλεπιδράσεων. Το μειονέκτημα της είναι ότι το σύστημα δεν είναι γενικό και δεν προσεγγίζει τόσο τον όρο –ομική.

Η δεύτερη προσέγγιση είναι η μελέτη του μεταβολικού δαχτυλικού αποτυπώματος. Κατά την προσέγγιση αυτή, σκοπός δεν είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός κάθε παρατηρούμενου μεταβολίτη αλλά η σύγκριση προτύπων ή αλλιώς των δαχτυλικών αποτυπωμάτων των μεταβολιτών με αντίστοιχα πρότυπα που προέρχονται από αλλαγές λόγω κάποιας ασθένειας, ή έκθεσης σε κάποια τοξική ουσία ή λόγω περιβαλλοντικών ή γενετικών αλλαγών. Η μελέτη του μεταβολικού δαχτυλικού αποτυπώματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν διαγνωστικό εργαλείο για την σύγκριση π.χ. του μεταβολικού δαχτυλικού αποτυπώματος ενός υγιή από έναν άνθρωπο που νοσεί. Η σύγκριση των δαχτυλικών αποτυπωμάτων πραγματοποιείται συνήθως με την χρήση στατιστικών εργαλείων όπως η Ιεραρχική Ανάλυση Σμηνών (Hierarchical Cluster Analysis) ή Ανάλυση Κύριων Στοιχείων (Principal Component Analysis). Η προσέγγιση αυτή όντας ημι-ποσοτική και ταυτόχρονα εφαρμόσιμη σε ένα μεγάλο εύρος μεταβολιτών είναι μια πραγματικά –ομική προσέγγιση.



Σχήμα 2.2: Στρατηγικές εφαρμογής μεταβολομικής

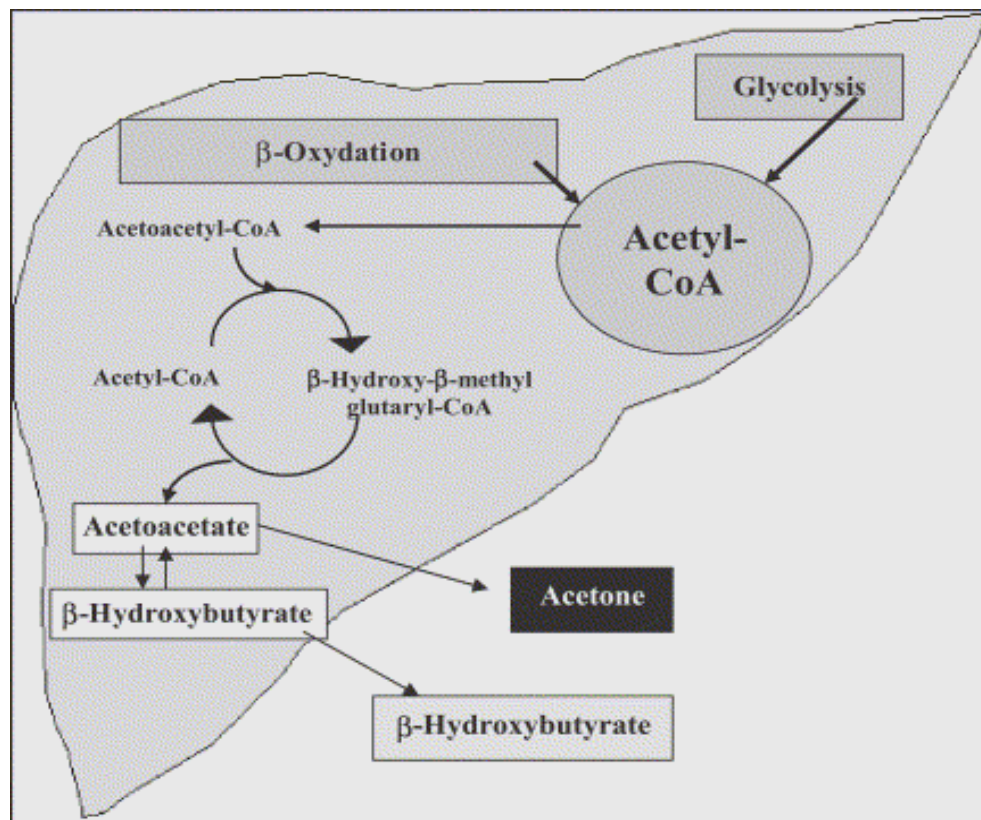
Οι αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή της μεταβολομικής περιλαμβάνουν τις τεχνολογίες NMR, FT-IR και MS, το τελευταίο εκ των οποίων, συνδυάζεται συνήθως με τεχνικές διαχωρισμού GC και LC. Η τεχνολογία του NMR είναι αυτή που βρίσκει μεγαλύτερη εφαρμογή σε μεσαίου και μεγάλου μεγέθους μόρια με κύρια πλεονεκτήματα αυτά των χαμηλών απαιτήσεων για προετοιμασία του δείγματος και της μη καταστροφής του δείγματος. Αντίθετα, όταν πρόκειται για μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους η φασματομετρία μάζας εμφανίζει εξαιρετικά αποτελέσματα και προτιμάται, με κύριο μειονέκτημα της, την απαίτηση για ένα μεγάλο στάδιο προετοιμασία του δείγματος, που μεταφράζεται συνήθως σε απώλειες των μεταβολιτών.

2.3.3 Μεταβολομική & Πτητικές Οργανικές Ενώσεις

Οι πτητικές οργανικές ενώσεις είναι ένα ιδιαίτερο κομμάτι του μεταβολώματος και απαντώνται στα ούρα, το αίμα και τον εκπνεόμενο αέρα. Στους πτητικούς οργανικούς μεταβολίτες περιλαμβάνονται ενώσεις που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες ουσιών όπως αυτές των αλδευδών, των αλκοολών, των κετονών, των υδρογονανθράκων, των τερπενίων κ.α [Mills G.A. et al 2001].

Οργανικές πτητικές ενώσεις που έχουν προσδιορισθεί στον εκπνεόμενο αέρα και έχουν συνδεθεί με μεταβολικά μονοπάτια περιγράφονται παρακάτω.

Ακετόνη: αποτελεί την μεγαλύτερη σε συγκέντρωση πτητική οργανική ένωση της ανθρώπινης εκπνοής. Η ακετόνη, συνδέεται με την μεταβολισμό της δεξτρόζης και την λιπόλυση [Miekisch W. et al. 2004]. Παράγεται από τα ηπατοκύτταρα μέσω της αποκαρβοξυλίωσης της περίσσειας του ακετύλο-CoA, που προέρχεται από την β-οξειδωση των λιπαρών οξέων. Το τελικό στάδιο παραγωγής της ακετόνης είναι η αποκαρβοξυλίωση του ακετοξικού οξέος που προέρχεται από την λιπόλυση ή την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Η ακετόνη μαζί με το ακετοξικό οξύ και το D-3 υδρόξυβουτυρικό οξύ χαρακτηρίζονται σαν κετονοσώματα, τα επίπεδα των οποίων αυξάνονται σε περιπτώσεις νηστείας και σε διαβητικούς. Γενικότερα η παραγωγή κετονοσωμάτων πραγματοποιείται όταν ο οργανισμός χρησιμοποιεί τα λίπη σαν πηγή ενέργειας εναλλακτικά της γλυκόζης. Η έλλειψη οξαλοξικού, το οποίο χρησιμοποιείται για την παραγωγή γλυκόζης κατά το μονοπάτι της γλυκονοογέννεσης, είναι ο λόγος που το ακετύλο-CoA δεν εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος αλλά ακολουθεί διαφορετική πορεία.

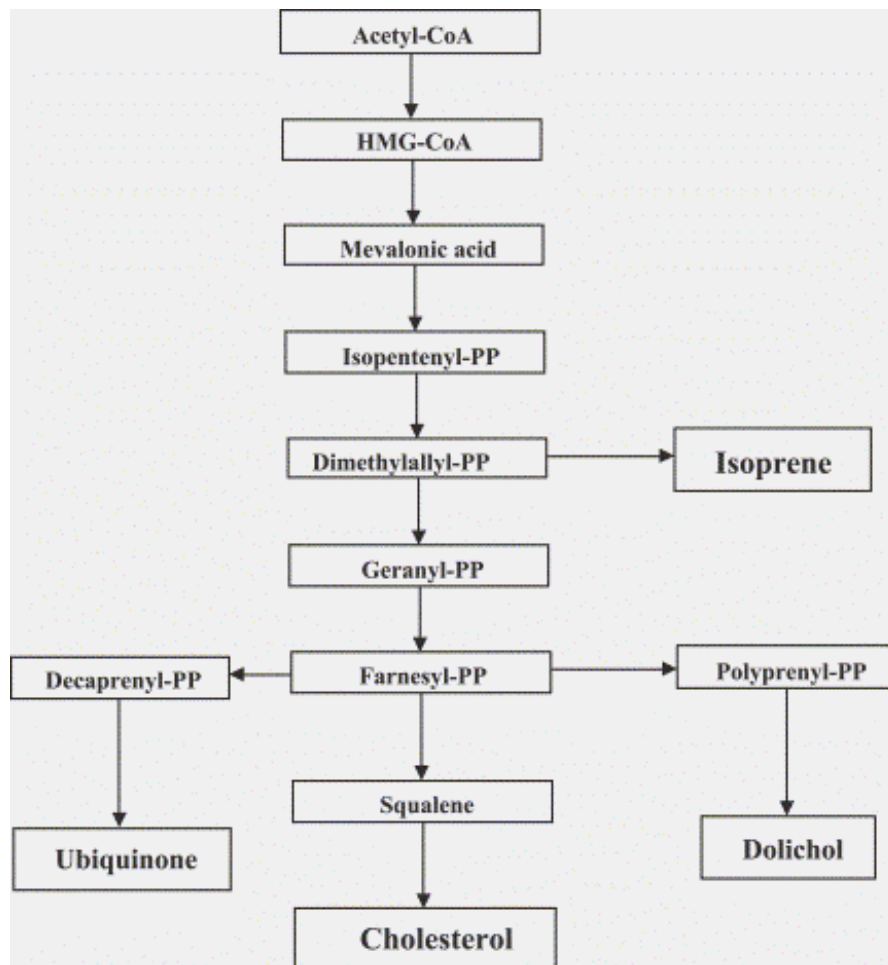


Σχήμα 2.3: Μεταβολισμός ακετόνης σε ηπατοκύτταρο

Ισοπρένιο: Ένα από τα πιο κοινά VOCs της ανθρώπινης εκπνοής είναι και το ισοπρένιο, το οποίο εμφανίζει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μεταξύ των υδρογονανθράκων. Σχηματίζεται σαν πρόδρομη ένωση πολλών σημαντικών ενώσεων και είναι σχεδόν πάντοτε παρών στην ανθρώπινη εκπνοή. Το ισοπρένιο σχηματίζεται παράλληλα κατά το μονοπάτι σύνθεσης της χοληστερόλης από το μεβαλονικό οξύ στο κυτοσόλιο [Stone B.G. et al. 1993, Hyspler et al. 2000]. Στα θηλαστικά το ισοπρένιο μπορεί να παραχθεί από μια αντίδραση που καταλύεται από την ισοπέντυλ-πυροφωσφορική ισομεράση που είναι εξαρτώμενη από τα ιόντα Mg^{2+} . Το ένζυμο αυτό καταλύει την συμπύκνωση του πυροφωσφορικού πεντυλίου με το πυροφωσφορικό διμέθυλαλλύλιο για τον σχηματισμό του πυροφωσφορικού γερανυλίου. Μια άλλη πιθανή πηγή ισοπρενίου είναι η υπεροξειδωση του σκουαλενίου [McGrath et al. 2001].

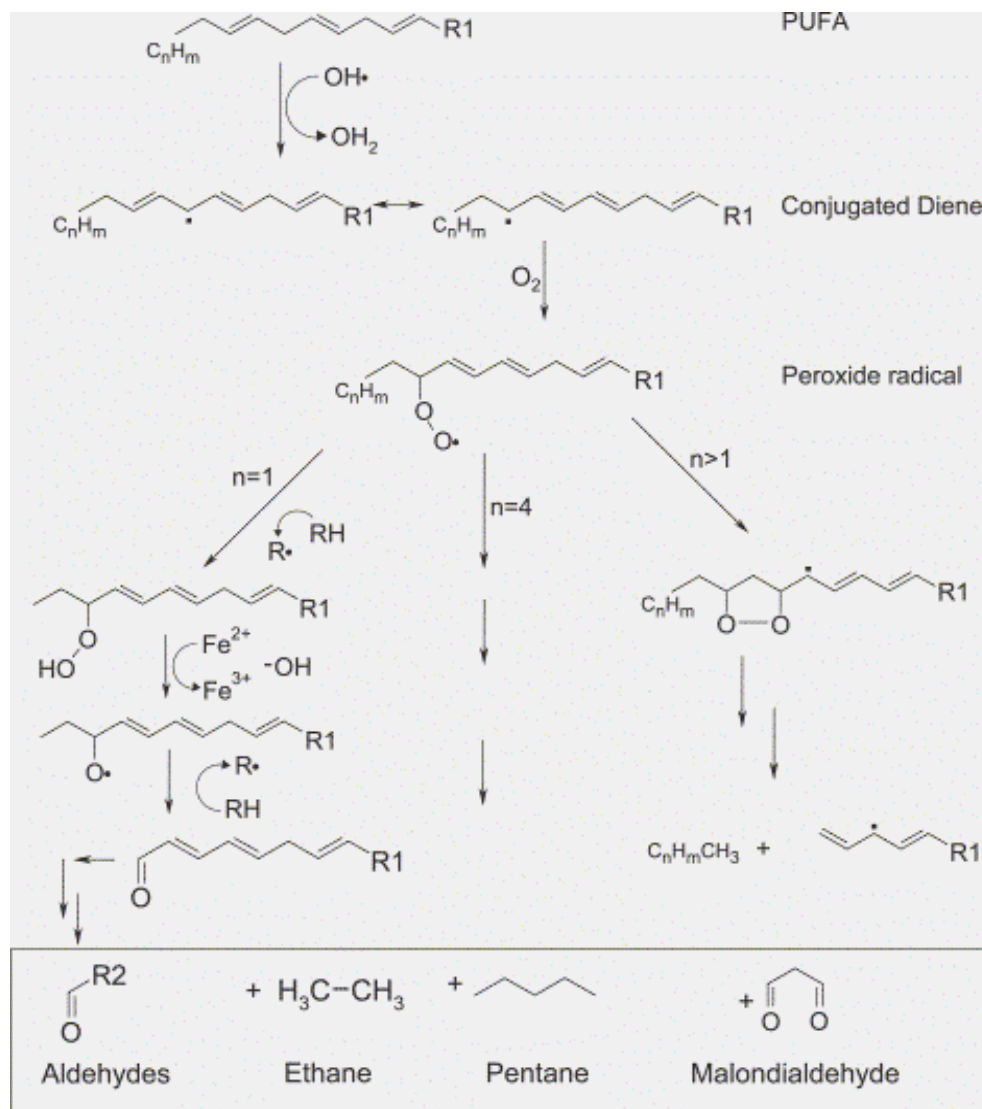
Η τιμή του ισοπρενίου στον εκπνεόμενο αέρα αυξάνει μέχρι την ηλικία των 25 ετών ενώ έχει σημαντικά μικρότερη τιμή σε παιδιά [Miekisch W. et al. 2004]

Τέλος θα πρέπει να σημειωθεί πως πρόσφατα, έχει προσδιοριστεί για την παραγωγή ισοπρενίου, σε συγκεκριμένα είδη φυτών ένα άλλο μεταβολικό μονοπάτι, εκτός αυτού του μεβαλονικού οξέος [Eisenreich et al. 2004].



Σχήμα 2.4: Μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής ισοπρενίου

Υδρογονάνθρακες: Η παρουσία υδρογονανθράκων ευθείας αλυσίδας (αιθάνιο και πεντάνιο) στον εκπνεόμενο αέρα είναι το αποτέλεσμα της υπεροξειδωσής των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες. Η λιπιδική υπεροξειδωση είναι μια διαδικασία απαλλαγμένη από την μεσολάβηση ριζών, στην οποία τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα επηρεάζονται οδηγώντας έτσι στον σχηματισμό μιας μεγάλης ποικιλίας δευτερογενών καρβονυλικών προϊόντων οξειδωσης που διαδοχικά εκκρίνονται στην εκπνοή. Το αιθάνιο και το πεντάνιο είναι οι κύριοι υδρογονάνθρακες που σχηματίζονται κατά την αποικοδόμηση των ω-3 και ω-6 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (λινολενικό, λινολεϊκό και αραχιδονικό οξύ) [Handelman G.J. et al. 2003]. Το πεντάνιο μπορεί να συσσωρευτεί στις αποθήκες λιπών του οργανισμού και να απελευθερωθεί αργά κατά την διάρκεια αρκετών ημερών. Το πεντάνιο μεταβολίζεται μερικώς από το ηπατικό κυτόχρωμα-P450 [Phillips M. et al. 1999]. Αντίθετα το αιθάνιο είναι πολύ πτητικό και σχετικά αδιάλυτο στους ιστούς. Το αιθάνιο απελευθερώνεται γρήγορα μετά τον σχηματισμό του με μικρό μεταβολισμό.



Σχήμα 2.5: Μεταβολικά μονοπάτια παραγωγής αιθανίου και πεντανίου

Οι πτητικές ενώσεις που περιέχουν θείο όπως αιθυλ-μερκαπτάνη, διμέθυλοσουλφίδιο, διμέθυλοδισουλφίδιο, προέρχονται από τον ατελή μεταβολισμό της μεθειονίνης κατά το μονοπάτι της τρανσαμίνωσης. Τα επίπεδα των ενώσεων που περιέχουν θείο είναι αυξημένα σε ασθενείς που πάσχουν από βλάβη στην λειτουργία του ήπατος [Miekisch W. et al. 2004].

Οι πτητικές οργανικές αμίνες, όπως η διμεθυλαμίνη και η τριμεθυλαμίνη έχουν προσδιοριστεί και αναγνωριστεί σαν υπεύθυνες για την χαρακτηριστική μυρωδιά της εκπνοής ανθρώπων που έχουν διαφόρων βαθμών νεφρική ανεπάρκεια [DiFrancesco et al. 2005]

Παρόλο που η μεταβολομική βρίσκεται στο αρχικό της στάδιο, μπορούμε να περιμένουμε εκπληκτικές εξελίξεις στο άμεσο μέλλον.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Λόγω της πολυπλοκότητας, της ετερογένειας και της παρουσίας πολλών διαφορετικών ουσιών σε επίπεδα που κυμαίνονται από pptv-ppbv, ο εκπνεόμενος αέρας ανήκει στα πιο περίπλοκα μέσα προς ανάλυση. Τα συνήθη στάδια της αναλυτικής διαδικασίας προσδιορισμού των οργανικών ενώσεων στον αέρα της ανθρώπινης εκπνοής είναι τα παρακάτω:

1. Συλλογή δείγματος εκπνοής
2. Προ-Συγκέντρωση των VOCs της εκπνοής
3. Ανάλυση των VOCs που έχουν συλλεχθεί

3.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ

Η ανάγκη για ανίχνευση ενώσεων στην ανθρώπινη εκπνοή που βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες, συχνά απαιτεί την συλλογή ενός μεγάλου όγκου δείγματος. Επιπλέον, η μη ύπαρξη πάντοτε της δυνατότητας μεταφοράς δειγμάτων εκπνοής άμεσα, στον χώρο ανάλυσης τους, έκανε επιτακτική την ανάγκη για κατάλληλα μέσα συλλογής και αποθήκευσης των δειγμάτων.

Οι βασικές απαιτήσεις για την επιλογή του κατάλληλου μέσου δειγματοληψίας της ανθρώπινης εκπνοής είναι:

- η σταθερότητα του δείγματος στο σύνολο των ενώσεων του ή σε συγκεκριμένες προς εξέταση, ενώσεις για χρόνο τουλάχιστον, μέχρι την στιγμή της ανάλυσης τους.
- η ευκολία στον χειρισμό τους
- η επαναχρησιμοποίηση τους
- το κόστος
- η ανθεκτικότητα κατά τον χειρισμό και ο μεγάλος χρόνος ζωής

Τα μέσα που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο στην συλλογή και αποθήκευσης της εκπνοής είναι τα **μεταλλικά δοχεία** (canisters) και οι **σακούλες δειγματοληψίας**.

3.2.1 Μεταλλικά Δοχεία

Τα **μεταλλικά δοχεία** εμφανίστηκαν αρχικά στην δεκαετία του '80 που η Αμερικανική Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος (Environmental Protection Agency, EPA) υιοθέτησε την χρήση μεταλλικών δοχείων για τις μεθόδους TO-14 και TO-14A για τον προσδιορισμό 40 μη πολικών VOCs [EPA 1988, EPA 1999a]. Η μέθοδος ξεπερνώντας διάφορα προηγούμενα προβλήματα της, εξελίχθηκε το 1999 και προτάθηκε σαν μια νέα μέθοδο, την TO-15 που αφορούσε πλέον τον προσδιορισμό 97 VOCs, συμπεριλαμβανομένου και πολικών ενώσεων μέσα σε αυτά [EPA 1999b].

Τα μεταλλικά δοχεία που χρησιμοποιούνται για την δειγματοληψία αέρα (εκπνοής, περιβαλλοντικό κ.α) κατασκευάζονται από ανοξείδωτο ατσάλι βαθμού 304 (18-20% Cr) ή βαθμού 316 (16-18% Cr). Τα μεταλλικά δοχεία πριν την χρήση τους, αδρανοποιούνται, με δύο διαδικασίες.

Η πρώτη διαδικασία αδρανοποίησης που εφαρμόζεται (SUMMA αδρανοποίηση) περιλαμβάνει την επίστρωση της επιφάνειας από ανοξείδωτο ατσάλι του δοχείου με ένα στρώμα καθαρού οξειδίου χρωμίου-νικελίου. Με τον τρόπο αυτό μειώνεται η δραστηριότητα και ο αριθμός των σημείων προσρόφησης του δοχείου. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από τον R.A Rasmussen στην δεκαετία του 1970 και τα δοχεία που υφίστανται αυτή την διαδικασία αναφέρονται σαν δοχεία SUMMA.

Η δεύτερη και πιο πρόσφατη μέθοδος αδρανοποίησης των δοχείων περιλαμβάνει την χημική σύνδεση στην επιφάνεια από ανοξείδωτο ατσάλι του δοχείου, ενός λεπτού στρώματος τετηγμένης πυριτίας (δοχεία FSL).

Αμφότερες οι τεχνικές εμφανίζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Αυτό που έχει σημασία ωστόσο, είναι η μεγάλη διαφοροποίηση που εμφανίζει η ποιότητα των δοχείων από κατασκευαστή σε κατασκευαστή. Τα δοχεία SUMMA κατασκευάζονται, μέχρι σήμερα, από τις BRC/Rasmussen (Portland/ Oregon), Meriter (San Jose/ CA), Restek Corporation (Bellefonte, PA) και Scientific Instrument Specialists (Moscow, ID). Τα δοχεία τετηγμένης πυριτίας (Fused-Silica-Lined, FSL) κατασκευάζονται από τις Entech Instruments (Simi Valley, CA) και Restek Corporation.



Σχήμα 3.1: Μεταλλικά δοχεία διαφορετικών όγκων συλλογής αέρα (1 L, 3 L, SUMMA 2 L)

Καθαρισμός μεταλλικών δοχείων πριν την συλλογή: η διαδικασία του καθαρισμού των μεταλλικών δοχείων μπορεί να πραγματοποιηθεί χειρωνακτικά ή να αυτοματοποιηθεί. Τα δοχεία, μαζί με την βαλβίδα που έχουν, περνάνε από τρεις κύκλους καθαρισμού (1 ώρα έκαστος) κατά τους οποίους διοχετεύεται στο δοχείο υγροποιημένος αέρας στους 100°C, πίεση στους 200 kPa (30 psig) και εκκενώνονται μέχρι την πίεση των -102 kPa (-30 in Hg). Πιο σχολαστικός καθαρισμός απαιτείται για τις περιπτώσεις εκείνες που οι συγκεντρώσεις των ενώσεων του δείγματος είναι πολύ μικρές. Έτσι για την περίπτωση των δοχείων SUMMA, ο καθαρισμός πραγματοποιείται με ατμό, και συγκεκριμένα με την προθήκη 50 mL ύδατος, ρύθμιση της πίεσης του δοχείου στα 70 kPa (10 psig) και θέρμανση στους 150-175 °C για 24 ώρες. Στα δοχεία FSL ο καθαρισμός ακολουθεί την ίδια διαδικασία με τα δοχεία SUMMA που αναφέρθηκε πιο πάνω με την διαφορά ότι αντί για ατμό χρησιμοποιούνται 5 mL καθαρού πεντανίου.

Γενικότερα, καθαρά θεωρούνται τα δοχεία που έχουν υπόλειμμα σε VOCs <0,02 ppbv, για κάθε μία από τις αναλυόμενες ενώσεις και για όγκο δείγματος αέρα, 500 mL [EPA 1999a, EPA 1999b].

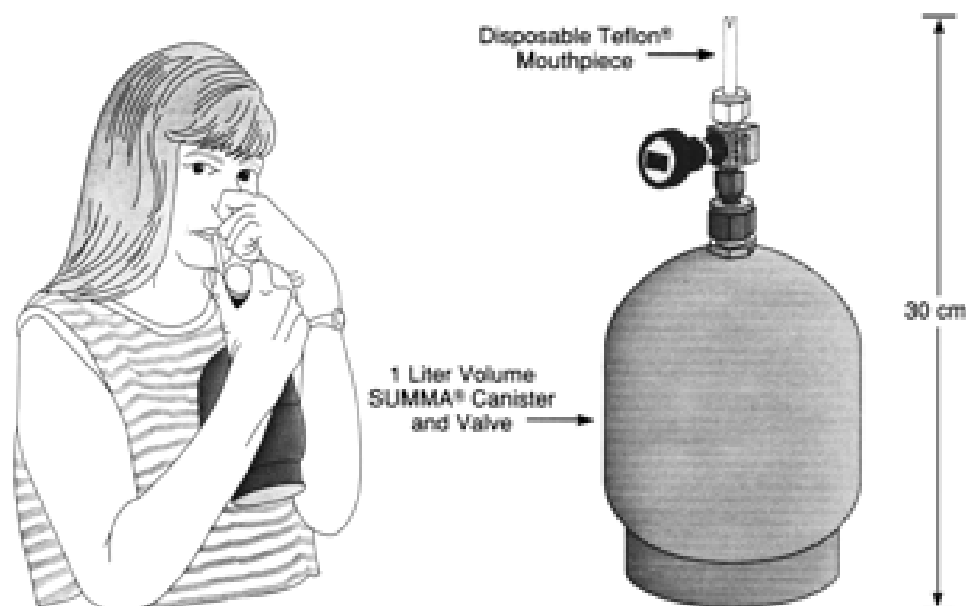
Σταθερότητα δείγματος σε μεταλλικά δοχεία

Η σταθερότητα των VOCs κατά την παραμονή τους σε ένα μεταλλικό δοχείο εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων συμπεριλαμβανομένου των:

- είδος του μεταλλικού δοχείου (SUMMA ή FSL)
- προηγούμενος αποτελεσματικός καθαρισμός
- δραστικότητα επιφάνειας δοχείου έναντι συγκεκριμένων VOCs
- ποσοστό υγρασίας δείγματος
- συνθήκες αποθήκευσης (θερμοκρασία, πίεση, υγρασία)
- χρόνος αποθήκευσης

Γενικότερα η αποθήκευση πολικών και μη πολικών VOCs για ένα εύρος από C₂-C₁₀ σε επίπεδα ppbv, τόσο σε SUMMA όσο και σε FLS δοχεία είναι καλή [McClenny W.A. et al. 1991, Oliver K.D. et al. 1986, Ochiai N. et al. 2002, Sin D.W.M. et al. 2001]. Οι κατηγορίες των ενώσεων που έχουν ελεγχθεί περιλαμβάνουν αλκοόλες, αλκάνια, αρωματικές ενώσεις, αλκένια, αιθέρες, τερπένια και κετόνες. Όσον αφορά την ανάλυση αρωματικών και χαμηλού μοριακού βάρους υδρογονανθράκων το χρονικό όριο είναι οι 14 ημέρες ενώ για τις υπόλοιπες ενώσεις ανάλογες με αυτές της εκπνοής το όριο είναι στις 30 ημέρες. Αντίθετα, για τις θειούχες ενώσεις, οι απώλειες στα δοχεία SUMMA είναι ιδιαίτερα σημαντικές κάτι που δεν συμβαίνει στα δοχεία FLS.

Για την ανάλυση της ανθρώπινης εκπνοής έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως τα δοχεία SUMMA [Pleil D.J. et al. 1995, Pleil D.J. et al. 1997] ενώ τα δοχεία FLS κυρίως για τον προσδιορισμό των θειούχων ενώσεων στην εκπνοή [Ochiai N. et al. 2001]. Οι όγκοι των δειγμάτων του εκπνεόμενου αέρα που έχουν συλλεχθεί με μεταλλικά δοχεία περιορίζονται στα 100-400mL.



Σχήμα 3.2: Δειγματοληψία αέρα ανθρώπινης εκπνοής με δοχείο SUMMA 1 L εξοπλισμένο με μιας χρήσης επιστόμιο από Teflon.

3.2.2 Σακούλες Δειγματοληψίας

Οι σακούλες δειγματοληψίας αέρα έχουν προταθεί αντίστοιχα με τα μεταλλικά δοχεία σε πολλές μεθόδους της EPA συμπεριλαμβανομένου της μεθόδου TCLP καθώς και των μεθόδων 3, 5, 18, 25, 25a, 40, 106 κ.α. Τα μεγέθη των όγκων δείγματος που μπορούν να συλλεχθούν ποικίλουν και κυμαίνονται από 0,5 L –100 L με πιο τυπικές τιμές αυτές του 1 L των 5 L και των 10 L. Το χαμηλό κόστος, (ένα κλάσμα του ποσού που απαιτείται για την αγορά μεταλλικών δοχείων), η πρακτικότητα στον χειρισμό και στον καθαρισμό τους, τις κάνει πιο δημοφιλείς από τα μεταλλικά δοχεία. Η εφαρμογή τους, στην δειγματοληψία εκπνεόμενου αέρα υπερέχει σημαντικά σε σχέση με τα μεταλλικά δοχεία [Steeghs M.M.L. et al. 2007a, Sanchez M.J. et al 2006, McGrath T.L. et al. 2001, Jones A.W. et al. 1995].

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται σήμερα για την κατασκευή τους είναι αρκετά. Ανάμεσα στα πιο κοινά συμπεριλαμβάνονται τα παρακάτω.

- Συμπολυμερές του τετραφθόρο-αιθυλενίου, εξαφθόρο-προπυλενίου (FEP), εμπορική ονομασία: *Teflon® FEP* (Dupont de Nemours)
- Πολυμερές του περφθόροαλκοξειδίου (PFA), εμπορική ονομασία: *Teflon® PFA* (Dupont de Nemours)
- Πολυτετραφθόρο-αιθυλένιο, (PTFE), εμπορική ονομασία: *Teflon® PTFE* (Dupont de Nemours) (Wilmington, DE, USA)
- Πολυβίνυλο-φθορίδιο (PVF), εμπορική ονομασία: *Tedlar®* (Dupont de Nemours)
- Αιθύλενο-τετραφθόρο-αιθυλένιο, (ETFE), εμπορική ονομασία: *Tefzel®* (Dupont de Nemours)
- Πολυαιθύλενο-τεταφθαλικός εστέρας, (PET), εμπορική ονομασία: *Nalophan®* (Kalle Nalo GmbH)
- Πολυβίνυλο-ίνδιο-χλωρίδιο, (PVDC), εμπορική ονομασία: *Saran®* (Dow Chemical Co.)

Η πλειονότητα της βιβλιογραφίας χρησιμοποιεί τις σακούλες Tedlar® για την συλλογή και αποθήκευση αέρα της ανθρώπινης εκπνοής.

Η σακούλα Tedlar® κατασκευάζεται από μεμβράνη πολυβίνυλο-φθοριδίου, το οποίο παράγεται από σκόνη πολυβίνυλο-φθοριδίου. Η σκόνη, διαλύεται σε έναν “λανθάνων διαλύτη” σε θερμοκρασίες πάνω από 100⁰C. Τα σωματίδια με αυτό τον τρόπο μορφοποιούνται σε μια λεπτή μεμβράνη πριν την εξάτμιση του διαλύτη. Ανάμεσα στους “ λανθάνοντες” διαλύτες που χρησιμοποιούνται, ο πιο κοινός είναι το N-N-διμέθυλακεταμίδιο. Μετά ακολουθεί η διαδικασία της ζήρασης, κατά την οποία απομακρύνεται ο διαλύτης ενώ το συνολικό ποσό που παραμένει στο υλικό είναι λιγότερο από 0,5%.

Καθαρισμός δειγματοληπτικής σακούλας:

Ο αποτελεσματικός καθαρισμός της σακούλας δειγματοληψίας είναι σημαντική διαδικασία, τόσο για νέο-χρησιμοποιούμενες όσο και για ξανά-χρησιμοποιούμενες σακούλες.

Όλες οι σακούλες εμφανίζουν ένα συγκεκριμένο βαθμό μόλυνσης που επηρεάζει άμεσα το όριο ανίχνευσης των VOCs του δείγματος. Επιμολύνσεις μπορεί να προέλθουν από προηγούμενες ενώσεις που έχουν προσροφηθεί στα τοιχώματα της

σακούλας, εκπομπές ουσιών από τα ίδια τα τοιχώματα της σακούλας ή ουσίες που απλά έχουν παραμείνει σε αυτήν. Όταν πρόκειται για σακούλες που χρησιμοποιούνται πρώτη φορά, οι επιμολύνσεις απομακρύνονται με μια σχετικά απλή διαδικασία που περιλαμβάνει το γέμισμα και το άδειασμα της σακούλας δειγματοληψίας με καθαρό αέρα ή με καθαρό άζωτο για καθορισμένο αριθμό επαναλήψεων. Όταν πρόκειται για σακούλες, που έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί και υπάρχει πιθανότητα να έχουν προσροφηθεί ουσίες στα τοιχώματα τους, συνήθως απαιτείται μια πιο σχολαστική πορεία, βασικό βήμα της οποίας είναι η εκρόφιση των ουσιών από τα τοιχώματα της σακούλας. Μερικά από τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό των σακουλών εμφανίζονται στο πιο κάτω πίνακα.

Πίνακας 3.1: Πρωτόκολλα καθαρισμού σακούλας δειγματοληψίας για συλλογή εκπνεόμενου αέρα

Α/Α	ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ	ΕΙΔΟΣ ΣΑΚΟΥΛΑΣ
1	<ul style="list-style-type: none"> • Συνεχόμενη έκπλυση με συνθετικό αέρα (80% N₂, 20% O₂) • Ροή 25 L h⁻¹ • Χρονική διάρκεια: 2 ώρες 	Tedlar [Steeghs M.M.L. et al. 2007]
2	<ul style="list-style-type: none"> • Έκπλυση με υψηλής καθαρότητας N₂ • 15 κύκλοι καθαρισμού • θέρμανση σακούλας 27°C 	Tedlar [McGarvey L.J. et al. 2000]
3	<ul style="list-style-type: none"> • Έκπλυση με υγροποιημένο αέρα • Θέρμανση σακούλας στους 45°C • Χρονική διάρκεια 15 λεπτά • 3 κύκλοι καθαρισμού 	Tedlar [Beauchamp J. et al. 2008]

Σταθερότητα δείγματος σε δειγματοληπτικές σακούλες

Η σταθερότητα του συλλεγθέντος δείγματος μέσα σε σακούλα δειγματοληψίας εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων σε αντιστοιχία με τα μεταλλικά δοχεία.. Οι κυριότεροι από αυτούς είναι:

- Διάχυση των VOCs λόγω διαπερατότητας της σακούλας
- Προσρόφιση των VOCs στα τοιχώματα της σακούλας
- Χρόνος αποθήκευσης
- Ποσοστά υγρασίας

Ο πιο σημαντικός παράγοντας απωλειών κατά την παραμονή των VOCs στις δειγματοληπτικές σακούλες, είναι η διάχυση λόγω της διαπερατότητας που εμφανίζουν. Η διάχυση, εξαρτάται άμεσα από την βαθμίδα συγκέντρωσης των VOCs μέσα και έξω από την δειγματοληπτική σακούλα. Οι απώλειες δηλαδή είναι μικρότερες, για μικρότερες διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων των VOCs στο εσωτερικό της σακούλας σε σχέση με το εξωτερικό της περιβάλλον. Η χρήση σακούλας δειγματοληψίας με μεγαλύτερο πάχος ή με πολλαπλά τοιχώματα ίσως να αποτελεί μια λύση.

Γενικότερα, για δείγματα ανθρώπινης εκπνοής, οι απώλειες σε VOCs περιορίζονται σε ένα ποσοστό λιγότερο από 10%, για αποθήκευση των δειγμάτων σε σακούλες για 52 ώρες [Steeghs M.M.L. et al. 2007b]. Όσον αφορά τις ενώσεις του θείου η σταθερότητα κατά την αποθήκευση τους σχετίζεται με ένα ποσοστό 90%

ανάκτησης τους, για χρονικό διάστημα αποθήκευσης 1 εβδομάδας [Sulyok M. et al. 2001].

Τέλος η σχετική υγρασία φαίνεται να έχει μικρή επίδραση στην ζωή των VOCs του δείγματος. Η ακετόνη και η αιθανόλη επηρεάζονται σημαντικά όταν το ποσοστό σχετικής υγρασίας του δείγματος είναι τρεις φορές μεγαλύτερο από αυτό που εμφανίζεται στην ανθρώπινη εκπνοή (υπερκορεσμένη κατάσταση).



Σχήμα 3.3: Σακούλες δειγματοληψίας αέρα (περιβαλλοντικού, εκπνοής), διαφορετικών υλικών και εξαρτημάτων πλήρωσης-στεγανοποίησης.

3.3 ΠΡΟ-ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ VOCs ΑΕΡΑ ΕΚΠΝΟΗΣ

Μετά την συλλογή του δείγματος της εκπνοής, σειρά έχει η προ-συγκέντρωση των VOCs που υπάρχουν στο δείγμα. Λόγω των εξαιρετικά μικρών επιπέδων των ουσιών αυτών η διαδικασία της προ-συγκέντρωσης είναι σημαντική για την αύξηση της ευαισθησίας, του ορίου ανίχνευσης και γενικότερα της αξιοπιστίας της αναλυτικής μεθόδου. Οι μέθοδοι προ-συγκέντρωσης των VOCs είναι οι εξής:

3.3.1 Ψυχρή Παγίδευση (κρυογενική)

Η μέθοδος της ψυχρής παγίδευσης εφαρμόστηκε αρχικά από τον L. Pauling και τους συνεργάτες του για την επιβεβαίωση της ύπαρξης των VOCs στην ανθρώπινη εκπνοή. Τυπικά ο εθελοντής εκπνέει μέσα σε ένα σωλήνα τύπου-U ο οποίος βρίσκεται βυθισμένος μερικώς σε ένα κρυογενικό υγρό (π.χ υγρό άζωτο, ακετόνη ψυγμένη με ξηρό πάγο) [Knutson M.D et al. 1996, Dannecker J.R. et al. 1981] Ο σωλήνας τύπου-U περιέχει συνήθως υάλινα σφαιρίδια, τα οποία αυξάνουν την επιφάνεια επαφής κι εκεί τα VOCs μπορούν να συμπυκνωθούν. Το δείγμα ακολούθως θερμαίνεται και τα VOCs εξατμίζονται και αναλύονται με συμβατικές αναλυτικές μεθόδους π.χ. αέρια χρωματογραφία.

Πίνακας 3.2: Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα προ-συγκέντρωσης αέρα εκπνοής με την μέθοδο της ψυχρής παγίδευσης

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ	ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
1. Υψηλή απόδοση παγίδευσης VOCs	1. Δύσκολη εφαρμογή εκτός εργαστηρίου 2. Μείωση του όγκου του αέρα της εκπνοής που διοχετεύεται λόγω παγώματος του νερού και του CO ₂ που περιέχει 3. Υψηλός κίνδυνος διαρροών λόγω αύξησης της πίεσης του συστήματος κατά την εξάτμιση του CO ₂ . 4. Οι υψηλές ποσότητες νερού στη εκπνοή μπορεί να καταστρέψουν την χρωματογραφική στήλη.

3.3.2 Χημική Παγίδευση

Κατά την διαδικασία της χημικής παγίδευσης ο εκπνεόμενος αέρας του εθελοντή διοχετεύεται με μορφή φυσαλίδων, μέσα από ένα διάλυμα. Το διάλυμα αυτό αντιδρά με μια, προς προσδιορισμό, ένωση από το δείγμα του εκπνεόμενου αέρα π.χ την αιθανόλη. Το διάλυμα συνήθως αλλάζει χρώμα και/ή το δείγμα αναλύεται στο εργαστήριο. Η τεχνική αυτή υπήρξε η βάση τόσο για τον προσδιορισμό του CO₂ στην εκπνοή από τον Lavoisier όσο και για τις χρωματομετρικές μεθόδους ανάλυσης της αιθανόλης και της ακετόνης [Henderson M.J. et al. 1952]. Παρόλο που η χρήση τέτοιων τεχνικών είναι ξεπερασμένη καινούργιες παραλλαγές αυτών έχουν εφαρμοστεί πρόσφατα και αφορούσαν στην ανίχνευση της ακετόνης [Teshima N. et al. 2005] και του διθειάνθρακα στην ανθρώπινη εκπνοή.

Πίνακας 3.3: Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα προ-συγκέντρωσης αέρα εκπνοής με χημική παγίδευση

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ	ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
1. Απλή και ολιγοδάπανη	1. Περιορισμός στην επιλογή μιας ένωσης της εκπνοής για ανίχνευση της κάθε φορά.
2. Η συλλογή & συγκέντρωση του δείγματος πραγματοποιείται σε ένα στάδιο.	2. Μικρή ευαισθησία
3. Εύκολη στην χρήση και εκτός εργαστηρίου	3. Υψηλή αντίσταση κατά την εκπνοή, δυσκολίες όταν πρόκειται για δείγμα ηλικιωμένων.
4. Βολική για ενώσεις σε υψηλές συγκεντρώσεις	4. Χρονοβόρα
5. Η χρωματική αλλαγή που μπορεί να εκτιμηθεί χωρίς την χρήση οργάνων, με γυμνό οφθαλμό.	

3.3.3 Παγίδευση με Προσρόφηση

Στην προ-συγκέντρωση με προσρόφηση τα VOCs του αέρα της εκπνοής παγιδεύονται από διάφορα υλικά όπως οι προσροφητικές παγίδες ή μέσω της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Micro Extraction, SPME). Η διαδικασία αυτή είναι αντιστρεπτή, προκειμένου τα παγιδευμένα VOCs να εκλυθούν αργότερα, συνήθως με θέρμανση [Grote C. et al. 1997].

Συγκριτικά, η μέθοδος αυτή είναι εκείνη που εμφανίζεται περισσότερο βολική και είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη σήμερα.

Πίνακας 3.4: Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα μεθόδου παγίδευσης αέρα εκπνοής με προσρόφηση

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ	ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
1. Βολική στην συλλογή δείγματος κι εκτός εργαστηρίου	1. Υψηλή αντίσταση κατά την εκπνοή διαμέσου αυτών άρα απαιτείται η χρήση αντλιών
2. Συλλογή μεγάλου εύρους ουσιών	2. Ακριβή τεχνολογία και περίπλοκη
3. Υψηλή ευαισθησία (ppt)	3. Εκλεκτικότητα των υλικών σε κάποια VOCs σε σχέση με κάποια άλλα.
4. Μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν	4. Ο καθαρισμός των παγίδων για την παραπέρα χρήση τους απαιτεί χρονοβόρα και σχολαστική διαδικασία.

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται στην τεχνική της παγίδευσης με προσρόφηση της ανθρώπινης εκπνοής περιλαμβάνουν τις προσροφητικές παγίδες και την τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME). Παρακάτω περιγράφονται τα κυριότερα χαρακτηριστικά αυτών.

Προσροφητικές παγίδες: είναι συνήθως υάλινοι ή μεταλλικοί σωλήνες που περιέχουν ένα ή περισσότερα είδη προσροφητικών υλικών. Η επιλογή του κατάλληλου προσροφητικού υλικού είναι ιδιαίτερα σημαντική. Ο αριθμός των προσροφητικών υλικών είναι μεγάλος και η επιλογή μια απόφαση μάλλον δύσκολη. Το προσροφητικό υλικό, για να εγγυάται τον ακριβή προσδιορισμό των VOCs πρέπει να πληροί γενικότερα τα παρακάτω κριτήρια:

- Πλήρη εμπλουτισμό των προς ανάλυση ουσιών
Η ακριβής επιφάνεια και η δομή των πόρων δίνει μια πρόχειρη ένδειξη της προσροφητικής δύναμης του υλικού.
- Πλήρης και γρήγορη εκρόφηση των αναλυόμενων ουσιών.
- Ομογενή και αδρανή επιφάνεια
(για την αποφυγή σχηματισμού τεχνητών προϊόντων, την μη αντιστρεπτή προσρόφηση και των καταλυτικών αποτελεσμάτων κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας, της αποθήκευσης και εκρόφησης των πληρωμένων προσροφητικών παγίδων).
- Μικρή χημική συγγένεια με το νερό
- Μικρή προσροφητική ικανότητα για άλλα ανόργανα συστατικά του αέρα, όπως το μονοξείδιο του αζώτου, το διοξείδιο του θείου, το διοξείδιο του άνθρακα ή το όζον.
- Μεγάλη αδράνεια έναντι ισχυρά δραστικών ουσιών όπως το όζον.
- Μεγάλη μηχανική και θερμική σταθερότητα
- Πολλαπλή χρήση

Η προσροφητική ικανότητα ενός υλικού καθορίζεται από ένα άλλο μέγεθος, αυτό του **όγκου διαφυγής (breakthrough volume, BTV)**. Με τον όρο *όγκος διαφυγής*: εννοούμε τον όγκο του αερίου που απαιτείται, προκειμένου να εκροφηθεί πλήρως μια προσροφημένη ένωση από στρώμα ενός γραμμαρίου προσροφητικού υλικού σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία. Ο όγκος διαφυγής είναι ένα μέγεθος που μπορεί να προέλθει από τις εμπορικές ενδείξεις του κάθε υλικού, να υπολογιστεί βιβλιογραφικά με τις ισόθερμες προσρόφησης ή να προσδιοριστεί πειραματικά. Ο όγκος διαφυγής εξαρτάται από την θερμοκρασία, την ποσότητα νερού στο δείγμα και την ροή δειγματοληψίας των VOCs. Η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μείωση του όγκου διαφυγής. Η υψηλή υγρασία ενός δείγματος επίσης, μπορεί να μειώσει τον όγκο διαφυγής των ουσιών όταν το προσροφητικό υλικό των παγίδων προσροφά σημαντικά ποσά νερού. Ενώ τέλος έχει αποδειχθεί πως η ροή της δειγματοληψίας για την συλλογή του δείγματος, δεν επηρεάζει τον όγκο διαφυγής για ροές που κυμαίνονται από 50-500 ml/min



Σχήμα 3.4: Διαφορετικά είδη προσροφητικών παγίδων (μεταλλικές, υάλινες) με πώματα ασφαλείας.

Τα προσροφητικά υλικά του εμπορίου μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες:

1. Ανόργανα Υλικά
2. Προσροφητικά με βάση τον άνθρακα
3. Πορώδη Οργανικά Πολυμερή

Ανόργανα Υλικά: (silica gel, zeolite, alumina) τα υλικά αυτά έχουν περιορισμένη χρήση λόγω της ιδιαίτερα μεγάλης υδροφιλίας που εμφανίζουν.

Προσροφητικά με βάση τον άνθρακα: τα υλικά αυτά ταξινομούνται περαιτέρω ως προσροφητικά από ενεργοποιημένο άνθρακα (activated carbon), γραφίτοποιημένο άνθρακα (graphitized carbon black) και μοριακά κόσκινα από άνθρακα (carbon molecular sieves).

Πίνακας 3.5: Ιδιότητες προσροφητικών υλικών με βάση τον άνθρακα

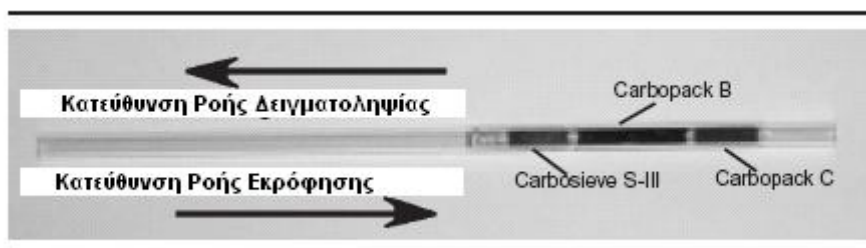
ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ
Ενεργοποιημένου άνθρακα (activated carbon)	Μικροπορώδη υλικά Ειδική επιφάνεια 800-1500 m ² /g Μεγάλο εύρος πόρων Θερμική σταθερότητα Μεγαλύτερη υδροφιλία σε σχέση με τα υλικά της κατηγορίας του
Γραφίτοποιημένου άνθρακα (graphitized carbon black)	Ειδική επιφάνεια 5-260 m ² /g Διαφορετικά μεγέθη πόρων Χαμηλή μηχανική σταθερότητα Μη-πολικά προσροφητικά μέσα Ομογενής επιφάνεια Υψηλή υδροφοβικότητα Εκλεκτικότητα ανάλογα με τη μορφή της ουσίας
Μοριακά κόσκινα από άνθρακα (carbon molecular sieves)	Μικροπορώδη υλικά Ειδική επιφάνεια 500-1200 m ² /g Συγκεκριμένο μέγεθος πόρων Όχι απόλυτα ομογενής επιφάνεια Θερμική-Μηχανική σταθερότητα Μη πολικά προσροφητικά μέσα Σχετική υδροφιλία

Πορώδη Οργανικά Πολυμερή: η ομάδα των προσροφητικών αυτών εμφανίζει ποικιλία στην ειδική επιφάνεια και την πολικότητα. Επειδή η διαδικασία παραγωγής τους είναι ελεγχόμενη πρόκειται για πολύ καθαρά υλικά. Μειονέκτημα αποτελεί η περιορισμένη θερμική σταθερότητα πολλών υλικών της κατηγορίας αυτής. Το Tenax (πολύ-2,6-διφαινυλ-πάρα φαινυλενοξειδίο) είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο υλικό της κατηγορίας των οργανικών πολυμερών.

Για την ανάλυση της ανθρώπινης εκπνοής έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα προσροφητικά υλικά όπως οργανικά πολυμερή (π.χ Tenax TA) [Tangerman A. et al. 1985], ενεργός άνθρακας [Mueller W. et al. 1998], γραφίτοποιημένος άνθρακας και μοριακά κόσκινα άνθρακα (π.χ Carboxen 1021) [Risby T.H. 2002]. Μέχρι στιγμής, κανένα προσροφητικό υλικό δεν μπορεί να παγιδεύσει, χωρίς απώλειες, το σύνολο των VOCs της ανθρώπινης εκπνοής. Έτσι, παρά την μεγάλη ποικιλία των εμπορικά διαθέσιμων προσροφητικών υλικών, δεν υπάρχει ένα προσροφητικό υλικό που να επιτρέπει την προσρόφηση και την εύκολη εκρόφηση, όλων των ουσιών της ανθρώπινης εκπνοής.

Για περιπτώσεις, όπως η εκπνοή, που η ποικιλία των ενώσεων που πρόκειται να προσδιοριστούν είναι μεγάλη, χρησιμοποιείται ο συνδυασμός περισσότερων από ένα, προσροφητικών υλικών. Η διάταξη των υλικών στον σωλήνα που τα περιέχει γίνεται με σειρά αυξανόμενης προσροφητικής ικανότητας. Με αυτό τον τρόπο, το πιο ισχυρό προσροφητικό υλικό προστατεύεται από ένα στρώμα λιγότερο ισχυρού προσροφητικού υλικού. Έτσι τα λιγότερο πτητικά VOCs παγιδεύονται πρώτα, στο

ασθενέστερο προσροφητικό υλικό που βρίσκεται στην αρχή του σωλήνα. Προοδευτικά, περισσότερα VOCs παγιδεύονται από τα επόμενα προσροφητικά υλικά που διατάσσονται κατά αυξημένη ισχύ μέσα στον σωλήνα, με τελικό εκείνο που παγιδεύει τα πιο πτητικά VOCs. Ένας τυπικός συνδυασμός προσροφητικών υλικών σε σωλήνα για την μέτρηση των VOCs της ανθρώπινης εκπνοής είναι ο αυτός που εικονίζεται στο Σχ. 3.5.

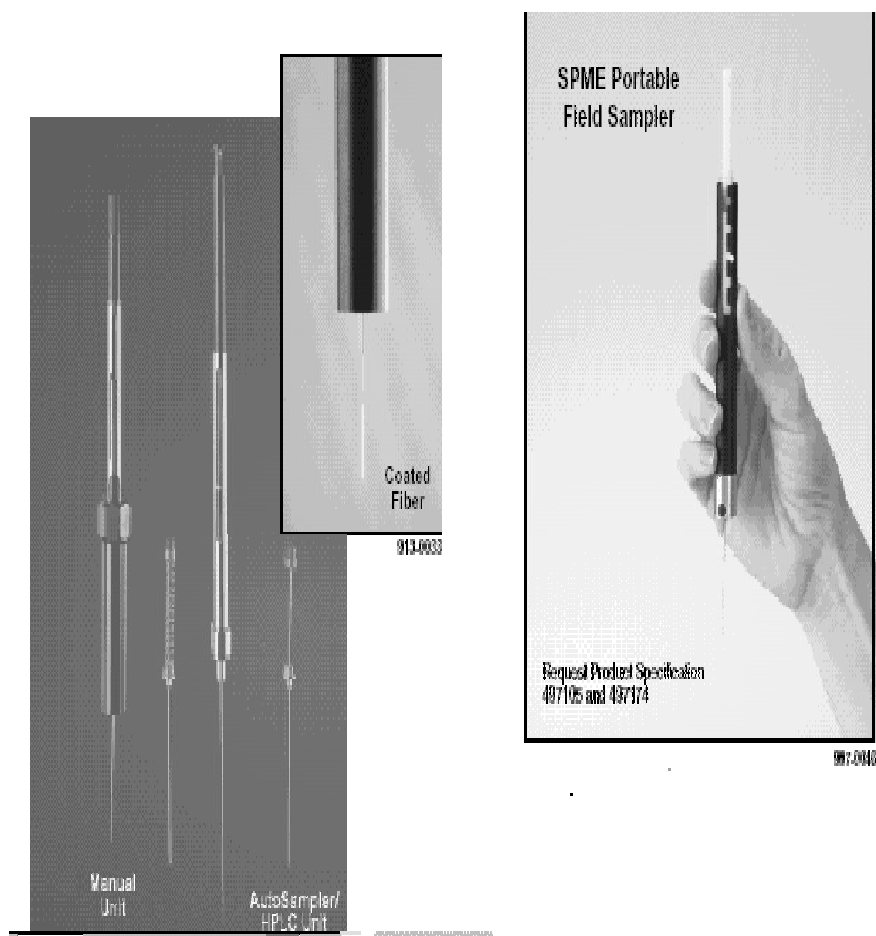


Σχήμα 3.5: Πολυστρωματική προσροφητική παγίδα με τρία προσροφητικά υλικά.

Μικρο-Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid-Phase Microextraction)

Η προ-συγκέντρωση μερικών VOCs έχει απλοποιηθεί με την εισαγωγή της τεχνικής της **Μικρο-Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (SPME)**. Η τεχνική SPME εισήχθη από τους Arthur και Pawliszyn στα τέλη του 1989, σαν μια γρήγορη τεχνική ανάλυσης πτητικών και ημι-πτητικών ενώσεων μέσα από μια ποικιλία μιτρών. Σκοπός της προσπάθειας αυτής ήταν να μειωθούν οι συνυπάρχοντες περιορισμοί που εμφανίζονταν στις εργαστηριακές αναλυτικές μεθόδους. Οι περισσότερες από αυτές περιλαμβάνουν διαδικασίες κατά τις οποίες απαιτούνται εκτός από χρόνο, κοπιαστική εργασία και πολλαπλά στάδια ανάλυσης. Η τεχνική SPME ενοποιεί την δειγματοληψία, την εκχύλιση, τη συγκέντρωση και την εισαγωγή του δείγματος σε ένα και μόνο βήμα, απουσίας μάλιστα διαλύτη.

Η τεχνική αυτή, χρησιμοποιεί μια τροποποιημένη σύριγγα η οποία έχει ενσωματωμένη μια μικρού μήκους ίνα (μικρο-ίνα) εξωτερικά επικαλυμμένη με μια λεπτή μεμβρανώδη στατική φάση πολυμερούς (πχ. Carbowax, DVB, PDMS, PA) ή εναλλακτικά ένα μείγμα πολυμερών συνδυασμένο με ένα στερεό πορώδες υλικό με βάση τον άνθρακα (πχ. PDMS-Carboxen). Η επικαλυμμένη ίνα εισάγεται είτε απευθείας μέσα στο δείγμα, είτε στην υπερκείμενη φάση αυτού (Headspace sampling) όπου οι προς ανάλυση ουσίες μεταφέρονται από το διάλυμα στην στατική φάση με προσρόφηση ή απορρόφηση. Μετά από την αποκατάσταση της ισορροπίας (μπορεί να διαρκέσει από μερικά λεπτά μέχρι αρκετές ώρες και εξαρτάται από την φύση της προς ανάλυσης ουσίας) ή μετά από καθορισμένο χρονικό διάστημα, η ίνα απομακρύνεται από το δείγμα και μεταφέρεται στο σύστημα εισαγωγής ενός αέριου χρωματογράφου ή σε κατάλληλα τροποποιημένη ρεοδυναμική βαλβίδα υγρού χρωματογράφου. Η ίνα εκτίθεται και η αναλυόμενη ουσία εκροφάται είτε θερμικά στο GC είτε εκλύεται από την κινητή φάση στην περίπτωση του HPLC.



Σχήμα 3.6: Σύστημα δειγματοληψίας της τεχνικής SPME

Η αποτελεσματικότητα της αναλυτικής μεθόδου, στον προσδιορισμό των ενώσεων, βασίζεται στην σωστή επιλογή του υλικού της ίνας SPME. Πριν την επιλογή, παράμετροι που πρέπει να εξεταστούν είναι:

- η πολικότητα των ενώσεων
- το εύρος των μοριακών βαρών
- η φύση του αρχικού δείγματος
- αναμενόμενα εύροι συγκεντρώσεων
- θερμοκρασία δειγματοληψίας
- τύπος ανιχνευτή που θα χρησιμοποιηθεί

Γενικότερα θα λέγαμε πως ίνες με πολικό υλικό επικάλυψης χρησιμοποιούνται για συλλογή πολικών ενώσεων και με μη πολικό υλικό για συλλογή μη πολικών ενώσεων.

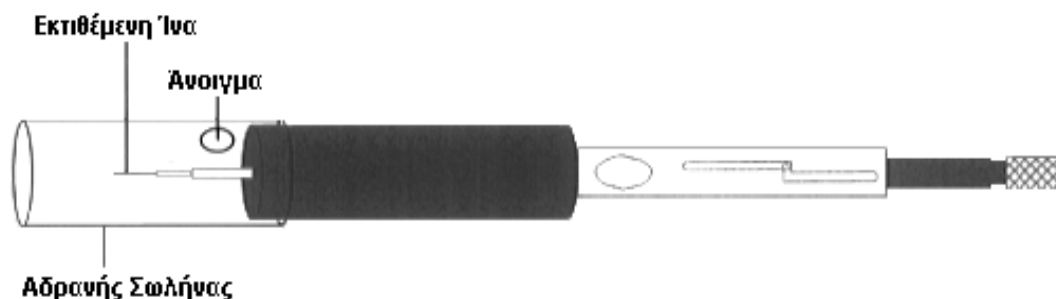
Πίνακας 3.6: Είδη πολυμερών για επικάλυψη ίνας SPME με αντίστοιχες εφαρμογές

Στατική Φάση	Συντομογραφία	Χρήσεις
Polydimethylsiloxane 100 μm 30 μm 7 μm	PDMS	Χαμηλού MB μη πολικές ενώσεις Μη πολικές ημι-πτητικές ενώσεις
Polydimethylsiloxane/ Divinylbenzene 65μm 60 μm	PDMS/DVB	Πολικές πτητικές οργανικές ενώσεις (αλκοόλες, αμίνες) Γενική χρήση
Carboxen/ Polydimethylsiloxane 75 μm	Car/PDMS	Ανάλυση ιχνών πτητικών οργανικών ενώσεων
Carbowax/Divinylbenzene 65 μm	CW/DVB	Πολικές ενώσεις (αλκοόλες)
Polyacrylate 85 μm	PA	Πολικές ημι-πτητικές ενώσεις (φαινόλες)

Σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους ανάλυσης, η μέθοδος SPME πλεονεκτεί έναντι αυτών στο ότι:

1. Δεν απαιτεί την χρήση διαλυτών και πολύπλοκων συσκευών
2. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό πτητικών, μη-πτητικών, ή ημιπτητικών ενώσεων τόσο στην υγρή όσο και στην αέρια φάση δείγματος
3. Παρέχει γραμμικά αποτελέσματα γύρω από ένα μεγάλο εύρος τιμών αναλυτικών συγκεντρώσεων (πιο χαμηλά και από ppt για ορισμένες ενώσεις)
4. Έχει την δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί σε οποιοδήποτε αέριο χρωματογράφο ή σύστημα αέριου χρωματογράφου-φασματομέτρου μάζας.

Στην ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί τόσο στην κλασική της μορφή (σύστημα SPME όπως κυκλοφορεί στο εμπόριο) [Guidotti M. et al. 2001, Hyspler R. et al. 2000, Deng C. et al. 2004] ή σε τροποποιημένη μορφή εξειδικευμένο για την ανάλυση της ανθρώπινης εκπνοής [Grote C. et al. 1997].

**Σχήμα 3.7: Τροποποιημένη Ίνα SPME για δειγματοληψία εκπνεόμενου αέρα [Grote C et al. 1997].**

3.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ

3.4.1 Αέρια Χρωματογραφία

Η πιο κοινή μέθοδος ανάλυσης εκπνεόμενου αέρα είναι η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC). Το δείγμα μεταφέρεται στη κορυφή της χρωματογραφικής στήλης και τα διαφορετικά συστατικά του διαχωρίζονται με την βοήθεια του φέροντος αερίου, που μαζί με το δείγμα αποτελεί την κινητή φάση. Πολλές μέθοδοι ανίχνευσης έχουν συνδυαστεί με την αέρια χρωματογραφία προκειμένου για την ταυτοποίηση των ενώσεων της ανθρώπινης εκπνοής. Οι πιο κοινές είναι ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, FID), η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) και η φασματομετρία κινητικότητας ιόντων (Ion Mobility Spectrometry, IMS).

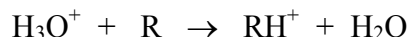
GC-FID: Ο FID είναι ένας χρήσιμος μη εξειδικευμένος ανιχνευτής για την ανάλυση των οργανικών ενώσεων, έχει υψηλή ευαισθησία, ένα μεγάλο εύρος γραμμικής απόκρισης και χαμηλό θόρυβο. Για τους λόγους αυτούς έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην ανάλυση κυρίως, συγκεκριμένων ενώσεων, της ανθρώπινης εκπνοής [Mendis S. et al. 1994, Kneepkens C.M.E. et al. 1994]. Πρόσφατα ο ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της ανθρώπινης εκπνοής με μεγάλη εκλεκτικότητα και με όρια ευαισθησίας στο επίπεδο των μερών στο δισεκατομμύριο (parts per billion, ppb) [Sanchez M.J. et al. 2003].

GC-MS: Οι ενώσεις ενός δείγματος αφού πρώτα διαχωριστούν μπορούν να αναγνωριστούν από το προφίλ των φορτισμένων ιόντων που προκύπτουν από την θραυσματοποίηση του μορίου κάθε ένωσης. Σήμερα, η τεχνική GC-MS έχει καθιερωθεί σαν την επίσημη τεχνική για την ανάλυση της ανθρώπινης εκπνοής. Έχει υιοθετηθεί επίσης για τον καθορισμό της έκθεσης σε αλογονομένα VOCs [Pleil D.J. et al. 1997] και σε συνδυασμό με χαμηλής θερμοκρασίας υαλώδης μικρο ίνες άνθρακα (low temperature glassy carbon microfiber, LTGC) για την μελέτη ενώσεων που σχετίζονται με τον καρκίνο των πνευμόνων σε επίπεδο μερών στο τρισεκατομμύριο (parts per trillion, ppt) [Giardina M. 2003].

GC-IMS: Η Φασματομετρία Ιοντικής Κινητικότητας (Ion Mobility Spectrometry IMS) εφευρέθηκε στα τέλη του 1960 με εφαρμογές στην ανίχνευση εκρηκτικών ή παράνομων ναρκωτικών. Η βασική αρχή λειτουργίας της βασίζεται στην μετατόπιση των ιόντων που σχηματίζονται από τις ενώσεις, λόγω της δράσης ενός εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου, σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Ο συνολικός χρόνος που θα ταξιδέψουν τα ιόντα είναι μια συνάρτηση του μήκους μετατόπισης (drift length) της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου, του αερίου μετατόπισης, της θερμοκρασίας και της ατμοσφαιρικής πίεσης. Το IMS είναι ένας ιδιαίτερα επιλεκτικός ανιχνευτής, ικανός για την ποσοτικοποίηση των προς ανάλυση ενώσεων ανάμεσα από ένα περίπλοκο μίγμα. Επιπλέον είναι φορητό και χαμηλού κόστους. Αν χρησιμοποιηθεί σαν παράγοντας ιονισμού κάποιο άλλο μέσο πέραν του νερού, βελτιώνεται η ευαισθησία της μέτρησης. Το GC-IMS ενώνει δύο τεχνολογίες για την παραγωγή μιας νέας διάταξης που ενσωματώνει τα πλεονεκτήματα της κάθε τεχνολογίας ξεχωριστά. Το GC-IMS χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της παρουσίας ακετόνης και αιθανόλης ως σημαντικοί βιολογικοί δείκτες της ανθρώπινης υγείας. Τα εκτιμώμενα όρια ανίχνευσης για την ακετόνη και την αιθανόλη ήταν 0,4 και 0,5 μg/L, αντίστοιχα [Lord H. et al. 2002].

3.4.2 Φασματομετρία Μάζας μέσω Αντίδρασης Μεταφοράς Πρωτονίων (PTR-MS)

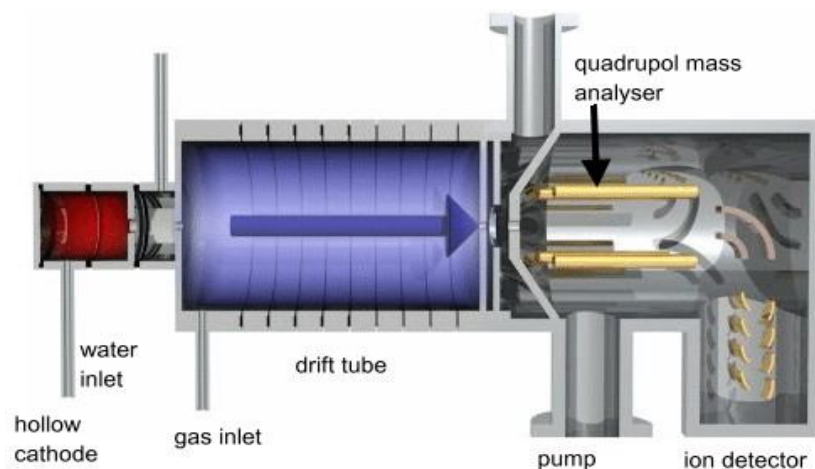
Το φασματόμετρο μάζας μέσω αντίδρασης μεταφοράς πρωτονίων (Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry PTR-MS) αναπτύχθηκε πριν σχεδόν μια δεκαετία με στόχο την γρήγορη μέτρηση περίπλοκων μιγμάτων VOCs στον ατμοσφαιρικό αέρα και σε συγκεντρώσεις στο επίπεδο των ppbv. Οι οργανικές ενώσεις ιονίζονται μέσω αντίδρασης μεταφοράς πρωτονίων, από ιόντα H_3O^+ και ανιχνεύονται.



(Το R είναι μια οποιαδήποτε αέρια οργανική ένωση ικανή να αντιδρά με τα ιόντα H_3O^+). Η αντίδραση μεταφοράς πρωτονίων πραγματοποιείται μόνο αν η πρωτονική συγγένεια της αναλυόμενης ένωσης είναι μεγαλύτερη από αυτή του νερού. Που μεταφράζεται στο ότι το PTR-MS είναι ικανό να ανιχνεύει τις περισσότερες αλδεύδες, κετόνες, αλκοόλες, οξέα και εστέρες καθώς και πολλούς ακόρεστους αρωματικούς με N και S υποκατεστημένους υδρογονάνθρακες. Ενώ αντίθετα αλκάνια, μεθυλιωμένα αλκάνια και μερικά αλκένια δεν μπορούν να μετρηθούν με την τεχνική αυτή λόγω της χαμηλής πρωτονικής τους συγγένειας. Συνήθεις συστατικά του αέρα όπως (NO , CO , CO_2 , O_2 κτλ) δεν δημιουργούν παρεμβολές λόγω της χαμηλής τους πρωτονικής συγγένειας.

Η ανάλυση του αέρα της ανθρώπινης εκπνοής με PTR-MS, έχει σημαντικά πλεονεκτήματα: τα μίγματα των αερίων μπορούν να αναλυθούν σύντομα χωρίς προηγούμενη συγκέντρωση τους και διαδικασίες διαχωρισμού, ενώσεις που εμφανίζονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις όπως N_2 , CO_2 , O_2 , H_2O δεν επιδρούν στην μέτρηση, το όργανο έχει μεγάλη ευαισθησία (pptv), ενώ είναι εφαρμόσιμες οι συχνές και σύντομες μετρήσεις. Για τους λόγους αυτούς η PTR-MS είναι μια ελπιδοφόρα τεχνική για την ανάλυση των VOCs στην εκπνοή και χρησιμοποιείται για άμεσες και επαναλαμβανόμενες πολλαπλές μετρήσεις.

Το PTR-MS έχει χρησιμοποιηθεί στον εκπνεόμενο αέρα, σε αναλύσεις που περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ισοπρενίου σε σχέση με τα επίπεδα της χοληστερόλης στο αίμα, σε επίπεδο μερικών εκατοντάδων ppb [Karl T. et al. 2001]. Καθώς επίσης και για την σύγκριση των VOCs της εκπνοής σε ασθενείς με καρκίνου του πνεύμονα και υγιείς εθελοντές [Steeghs L.M.M. et al. 2007].

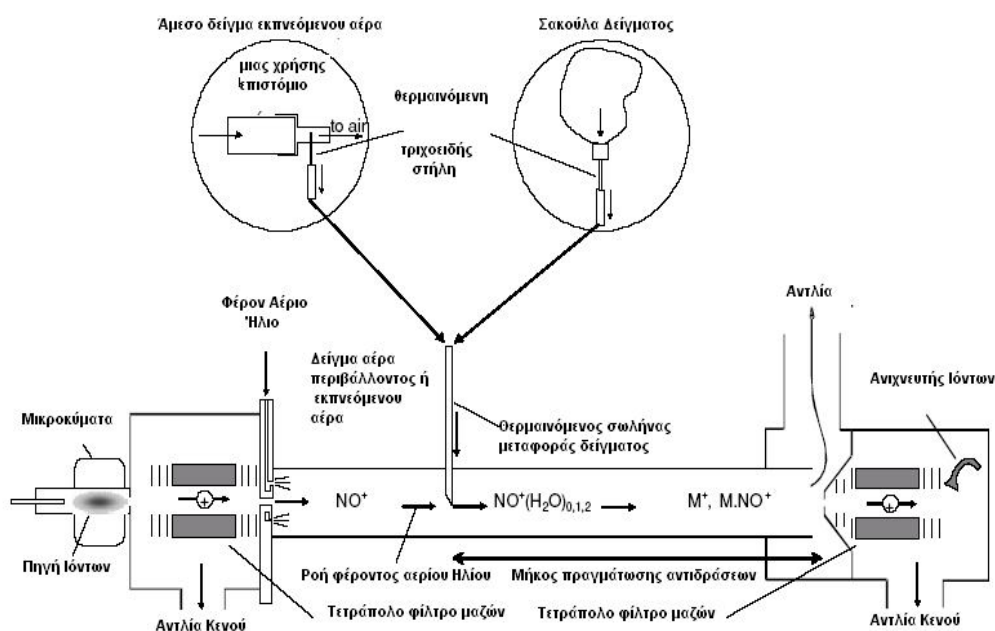


Σχήμα 3.8: Τα επιμέρους τμήματα ενός PTR-MS. (Hollow cathode): χώρος παραγωγής ιόντων H_3O^+ . (Drift tube): χώρος που πραγματοποιείται η αντίδραση μεταφοράς πρωτονίων (Gas inlet): είσοδος του αναλυόμενου μίγματος αερίων.

3.4.3 Φασματομετρία Μάζας- Σωλήνας Ροής Επιλεγμένων Ιόντων (SIFT-MS)

Η φασματομετρία μάζας μέσω σωλήνα ροής επιλεγμένων ιόντων (Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry SIFT-MS) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα το 1996. Στην ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα, η τεχνική SIFT χρησιμοποιείται σαν μια συσκευή αντίδρασης με ροή, έτσι ώστε να πραγματοποιηθούν γρήγορες και πραγματικού χρόνου αναλύσεις των χαμηλής συγκέντρωσης ουσιών της εκπνοής. Ένα δείγμα εκπνοής εισάγεται στην συσκευή SIFT είτε μέσω μια σακούλας (συνήθως 1L) ή απευθείας από το στόμα του εθελοντή. Οι ενώσεις του δείγματος αντιδρούν με τα ιόντα, προς σχηματισμό ιονισμένων προϊόντων που είναι χαρακτηριστικά των προς ανάλυση ενώσεων. Στην συνέχεια ανιχνεύονται και ποσοτικοποιούνται με τη βοήθεια ενός φασματόμετρου μάζας.

Η βασική αρχή της τεχνικής SIFT είναι απλή και παρουσιάζεται στο Σχ. 3.9. Αρχικά από μια πηγή ιόντων (πρόσκρουσης ηλεκτρονίων ή μικροκυμάτων) δημιουργούνται πρόδρομα ιόντα (θετικά ή αρνητικά). Το μίγμα των ιόντων διοχετεύεται μέσα σε ένα θάλαμο όπου με την βοήθεια ενός τετράπολου φίλτρου μαζών γίνεται επιλογή ενός ρεύματος ιόντων συγκεκριμένου λόγου m/q. Το ρεύμα των ιόντων μεταφέρεται σε έναν σωλήνα που περιέχει φέρον αέριο σε γρήγορη ροή. Τα ιόντα θερμαίνονται λόγω μεταφοράς θερμότητας αντιδρούν με τις ενώσεις που πρόκειται να προσδιοριστούν και στην συνέχεια διαβιβάζονται σε έναν δεύτερο θάλαμο όπου διαχωρίζονται από ένα δεύτερο τετράπολο φίλτρο μαζών και ανιχνεύονται. Το φάσμα μάζας καταγράφεται σε έναν υπολογιστή.



Σχήμα 3.9: Βασικά τμήματα της συσκευής SIFT-MS για την ανάλυση εκπνεόμενου αέρα.

Η τεχνική SIFT-MS έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του ισοπρενίου (30 υγιείς εθελοντές για συνεχόμενη περίοδο 6 μηνών με πρόδρομα ιόντα NO^+) [Turner C. et al. 2006], για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αιθανόλης, ακεταλδεύδης, αμμωνίας, ακετόνης και υγρασίας, μετά την κατανάλωση αλκοόλ [Smith D. et al. 2002] καθώς και σε μετρήσεις αιθανόλης στην εκπνοή οι οποίες συνδυάστηκαν με μετρήσεις στην υπερκείμενη φάση δειγμάτων αίματος εθελοντών οι οποίοι είχαν προτίστως καταναλώσει ουίσκυ [Wilson F.P., et al. 2001].

3.4.4 Χημικοί Αισθητήρες

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, υπάρχει μια μεγάλη αύξηση στην ανάπτυξη των αισθητήρων για διάφορες εφαρμογές που σχετίζονται περισσότερο με την βιομηχανία τροφίμων.

Οι κυριότερες κατηγορίες αισθητήρων αερίων είναι οι:

1. αισθητήρες οξειδίων των μετάλλων
2. αισθητήρες αγώγιμων πολυμερών
3. αισθητήρες από κρύσταλλο χαλαζία (Quartz Crystal MicroBallance, QCM ή QMB)

Οι αισθητήρες αν και θεωρούνται εκλεκτικοί ανιχνευτές ενώσεων, το βασικό τους μειονέκτημα είναι οι παρεμβολές που εμφανίζουν κατά την μέτρηση από άλλες ενώσεις. Για να υπερνικηθεί αυτή η έλλειψη εκλεκτικότητας, αναπτύχθηκε λογική της συστοιχίας αισθητήρων, γνωστές σήμερα σαν «ηλεκτρονικές μύτες». Στις ηλεκτρονικές μύτες περιλαμβάνονται μια σειρά από μη εκλεκτικούς αισθητήρες αερίων που είναι συζευγμένοι με τεχνικές αναγνώρισης προτύπων.

Η εφαρμογή των χημικών αισθητήρων για τον προσδιορισμό ενώσεων στην ανθρώπινη εκπνοή έχει παρουσιαστεί σε διάφορες εργασίες. Πιο συγκεκριμένα ο συνδυασμός οχτώ αισθητήρων από χαλαζία επιστρωμένων με διαφορετικές μεταλλοπορφυρίνες σε συνδυασμό με πρότυπα αναγνώρισης που βασίζονται στην Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) για τον εντοπισμό ασθενών που πάσχουν από καρκίνο στους πνεύμονες παρουσίασε καλή ευαισθησία για αρωματικές ενώσεις και αλκάνια [Natale D.C. et al 2003]. Η εφαρμογή ενός (QMB) αισθητήρα τροποποιημένου με Ag^+ -ZSM-5 ζεόλιθο για την διάγνωση του διαβήτη παρουσίασε μεγάλη ευαισθησία, καλή επιλεκτικότητα και καλή αναπαραγωγιμότητα στην ακετόνη της εκπνοής διαβητικών εθελοντών [Huang H.H. et al. 2004].



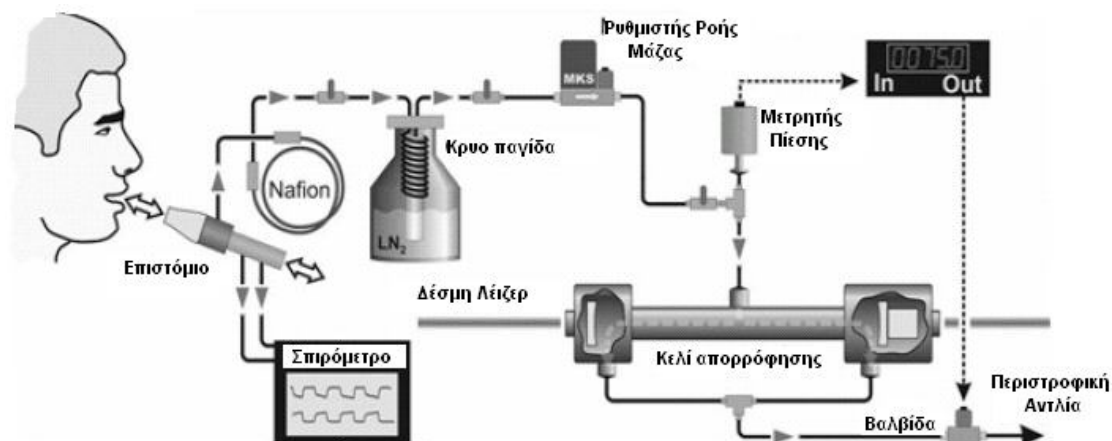
Σχήμα 3.10: α.Συστοιχία 32 αισθητήρων αερίων της εταιρίας JPL (e-Nose) και β.Συστοιχία 32 αισθητήρων αερίων (Cyranose-320)

3.4.5 Οπτική Απορρόφηση

Τα τελευταία χρόνια τα φασματομετρικά συστήματα οπτικής απορρόφησης έχουν δημιουργήσει νέες δυνατότητες στην ανάλυση αερίων, ενώ η αυξημένη ευαισθησία σε συνδυασμό με τις τεχνικές διαμόρφωσης τους προσφέρουν μια ιδιαίτερη δυναμική στην μέτρηση ιχνών. Παρόλο που η υψηλής ανάλυσης οπτικές μέθοδοι είναι

εύχρηστες για πιο καθορισμένα είδη ενώσεων ωστόσο προσφέρουν μια πιο γρήγορη εκτίμηση των δειγμάτων με πλεονέκτημα στην χρήση τους, τον πραγματικό χρόνο ανάλυσης.

Οι περισσότερες οπτικές μέθοδοι βασίζονται στην φασματοσκοπία απορρόφησης: κατά την οποία το αέριο δείγμα μεταφέρεται σε ένα κελί απορρόφησης και μετράται η μείωση λόγω απορρόφησης της δέσμης ακτινοβολίας του λέιζερ. Οι εφαρμογές τους στην ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα αφορούν τον προσδιορισμό του αιθανίου [Skelton D.K. et al. 2005] τον ταυτόχρονο προσδιορισμό NO και CO₂ [Roller C. et al. 2002] και της ακετόνης [Wang J.C. et al. 2004].



Σχήμα 3.11: Σχηματική παράσταση διάταξης ανάλυσης εκπνεόμενου αέρα με χρήση λέιζερ [Murtz M. et al. 2000].

3.4.6 Χρωματομετρικές Αναλύσεις

Μερικές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει χρωματομετρικές τεχνικές για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων VOCs της ανθρώπινης εκπνοής όπως η ακετόνη [Teshima N. et al. 2005]. Η χημεία για τον προσδιορισμό της, βασίζεται στην αντίδραση της ακετόνης με μια αλκαλική σαλικυλαλδεύδη με σκοπό τον σχηματισμό ενός έγχρωμου προϊόντος που απορροφά στην μπλε περιοχή του φάσματος και μπορεί να παρακολουθηθεί με Ga N-LEDs και εκπομπή επικεντρωμένη στα 465 nm. Η μέθοδος αυτή είναι αρκούντως ευαίσθητη για την ανάλυση της ακετόνης στην εκπνοή ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση συγκεκριμένων ενώσεων σε αυτήν αλλά όχι για την ανίχνευση πολλών ουσιών ταυτόχρονα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΟΥ & ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ

4.1 ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ & ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΚΟΠΙΑ

Προκειμένου να εξεταστεί, αν η χημική ανάλυση των ουσιών που προέρχονται από το αίμα, τα ούρα και κυρίως τον εκπνεόμενο αέρα των ανθρώπων που είναι εγκλωβισμένοι μετά την κατάρρευση ενός κτηρίου, μπορεί να εφαρμοστεί για την ενίσχυση των επιχειρήσεων εντοπισμού και διάσωσης, ήταν απαραίτητη η ανάπτυξη μιας “θεωρίας” εγκλωβισμού που μεταφράζεται σε ταξινόμηση των διαφορετικών καταστάσεων εγκλωβισμού.

Η ταξινόμηση πραγματοποιήθηκε με βάση δύο παραμέτρους: τον βαθμό τραυματισμού των εγκλωβισμένων και την διάρκεια του εγκλωβισμού. Οι κατηγορίες που προέκυψαν ήταν τρεις: Α (άνθρωποι με υψηλό στρες και μικρού βαθμού τραυματισμούς), Β (άνθρωποι με σοβαρούς τραυματισμούς σε διάφορα ζωτικά όργανα, πολυτραυματίες) και Γ (νεκροί άνθρωποι). Οι κατηγορίες Α και Β, χωρίζονται επιμέρους σε δύο υποκατηγορίες η κάθε μία ανάλογα με την διάρκεια του εγκλωβισμού, τις Α₁, Β₁ (λιγότερο από 24 ώρες) και Α₂, Β₂ (για περισσότερο από 24 ώρες). Στην συνέχεια ακολουθεί περιγραφή των διαφορετικών κατηγοριών των εγκλωβισμένων με βάση τις νευροενδοκρινικές, μεταβολικές και σωματικές τους αντιδράσεις.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ταξινόμηση αυτή είναι απλοποιημένη και κατά μία έννοια “αυθαίρετη”. Οι καταστάσεις του εγκλωβισμού εμφανίζουν σαφώς μεγαλύτερη πολυπλοκότητα για πολλούς λόγους (π.χ. προηγούμενη ιατρική κατάσταση). Ωστόσο η ταξινόμηση αυτή αποτέλεσε την βάση για μια περισσότερο μεθοδευμένη εργασία της παρούσας διατριβής και παρείχε το υπόστρωμα για την επιλογή των ομάδων που θα αποτελέσουν το πειραματικό υλικό της διατριβής.

4.2 ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ Α

Η κατάσταση Α περιγράφει την κατηγορία των εγκλωβισμένων χωρίς σοβαρές κακώσεις, με έντονο στρες. Σε συνάρτηση με το χρονικό διάστημα του εγκλωβισμού, η παραπάνω κατηγορία διαχωρίζεται στις εξής επιμέρους καταστάσεις:

❖ Κατάσταση Α₁ ή φάση “Ebb” (χρονική διάρκεια μέχρι 24h)

Η κατάσταση Α₁ που περιγράφεται σαν φάση Ebb [Cuthbertson D.P. 1932, Frayn K.N. 1986] περιλαμβάνει τις παρακάτω νευροενδοκρινικές, μεταβολικές και σωματικές αντιδράσεις :

α) Νευροενδοκρινικές αντιδράσεις

Είναι γνωστό ότι η αντίδραση στον τραυματισμό μπορεί να ξεκινήσει πριν τον τραυματισμό απλά με τη γνώση και μόνο ότι ο κίνδυνος πλησιάζει. Έτσι εμφανίζεται ενεργοποίηση της περιοχής άμυνας του υποθαλάμου. Αποτέλεσμα αυτής της διεργασίας είναι η έκκριση μιας σειράς ορμονών της υπόφυσης συμπεριλαμβανομένου της φλοιοτροπίνης (ACTH), αυξητικής ορμόνης (GH)

προλακτίνης (PRL) και βαζοπρεσίνης (ADH). Αυτές με την σειρά τους ενεργοποιούν την έκκριση κυρίως νοραδρεναλίνης, αδρεναλίνης και γλυκοκορτικοειδών. Ηπίως εκκρίνονται ουσίες όπως είναι η ντοπαμίνη, η ισταμίνη, η σεροτονίνη, η ινσουλίνη, η προλακτίνη, α_2 μακροσφαιρίνες, η ιντερλευκίνη I και VI, η TNF – A, όπως και το NO στο αίμα. Η θυρεοτροπίνη (TSH) αυξάνει σ' αυτή τη φάση ενώ η τριϊωδοθυρονίνη (T3) και τέτραϊωδοθυρονίνη (T4) παραμένουν στα φυσιολογικά όρια.

β) Μεταβολικές αντιδράσεις

Σαν αποτέλεσμα της έκκρισης των παραπάνω ορμονών, συγκεκριμένες μεταβολικές αντιδράσεις εμφανίζονται. Έτσι έχουμε την εμφάνιση της λιπόλυσης με αποτέλεσμα να αυξάνουν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Επίσης ξεκινά η γλυκογονόλυση, εξαιτίας της δράσης της αδρεναλίνης, με αποτέλεσμα να αυξάνει ελαφρά το επίπεδο της γλυκόζης στο αίμα. Ακόμα, παρατηρείται αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων και παράλληλα αρχίζει ήπια παραγωγή κετοσωμάτων [Frayn K.N. 1986]

γ) Σωματικές αντιδράσεις

Τόσο οι νευροενδοκρινικές όσο και οι μεταβολικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στην κατάσταση A₁, εξωτερικεύονται με τη μορφή σωματικών αντιδράσεων όπως υπεριδρωσία, ταχυκαρδία, υπέρταση, αύξηση της θερμοκρασίας και των αντανακλαστικών, μυδρίαση. Άλλα συμπτώματα είναι οι προκάρδιοι παλμοί, ο τρόμος, η ζάλη, η ανησυχία, η ναυτία, η διάρροια, η συχνουρία και έπειξη προς ούρηση, καθώς και αυξημένη συμπεριφορά πείνας.

❖ Κατάσταση A₂ ή φάση καταβολισμού (χρονική διάρκεια μεγαλύτερη από 24h)

Στην φάση αυτή αρχίζει ο καταβολισμός, δηλαδή κινητοποιούνται όλες οι αποθηκευμένες πηγές καυσίμων, προκειμένου να εξοικονομηθεί ενέργεια. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται είναι οι παρακάτω :

α) Νευροενδοκρινικές αντιδράσεις

Εκκρίνονται συμπαθητικές αδρενεργικές ουσίες, κατεχολαμίνες καθώς επίσης και ορμόνες της υπόφυσης, όπως η ACTH και η ADH. Άλλες ορμόνες που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος, είναι τα γλυκοκορτικοειδή και η αλδοστερόνη, που εκκρίνονται από τα επινεφρίδια, η ρεννίνη που εκκρίνεται από τους νεφρούς, καθώς επίσης και ουσίες του υποθάλαμου, όπως ενδορφίνες και εγκεφαλίνες, αλλά και κάποιες ιστικές, όπως η ισταμίνη, κινίνες, προσταγλανδίνες και σεροτονίνη.

β) Μεταβολικές αντιδράσεις

Παρατηρείται υπεργλυκαιμία, δηλαδή αυξημένη παραγωγή γλυκόζης. Αυτή οφείλεται στη συνδυασμένη δράση των κατεχολαμινών, της κορτιζόλης, της αυξητικής ορμόνης και της γλυκαγόνης, η οποία τώρα αρχίζει ουσιαστικά να παράγεται από το πάγκρεας. Η αναστολή της έκκρισης της ινσουλίνης, η οποία είναι

αναβολική ορμόνη, ενισχύει τη φάση του καταβολισμού. Η υπεργλυκαιμία *είναι* αποτέλεσμα μηχανισμών όπως είναι η αύξηση της γλυκογονόλυσης, λόγω αποικοδόμησης των υδατανθράκων, η αύξηση της νεογλυκογένεσης, κατά την οποία γίνεται αποικοδόμηση λιπών και πρωτεϊνών, και η παρεμπόδιση της εισόδου της γλυκόζης στο κύτταρο, εξαιτίας των μειωμένων επιπέδων ινσουλίνης. Αποτέλεσμα όλων των ανωτέρω είναι η αύξηση του γαλακτικού οξέος στο αίμα, δηλαδή η μεταβολική οξέωση καθώς επίσης και η αυξημένη παραγωγή κετοσωμάτων, δηλαδή ακετόνης, ακετοξικού και β-υδροξυβουτυρικού οξέος.

Πραγματοποιείται διάσπαση του μυϊκού λευκόματος σε αμινοξέα, κυρίως από την δράση της κορτιζόλης, που καταλήγει σε αύξηση του πυροσταφυλικού οξέος και της ουρίας στο αίμα, δηλαδή σε αύξηση της NH_3 . Επίσης γίνεται λιπόλυση, με αποτέλεσμα την αύξηση των λιπαρών οξέων, των τριγλυκεριδίων και του υδρόξυ – βουτυρικού οξέος. Παρατηρείται υπερκαλιαιμία και υπονατριαίμία, ενώ η δράση της ινσουλίνης που δεν είναι αρκετά έντονη, παρεμποδίζεται εξαιτίας της αυξημένης συγκέντρωσης των ανταγωνιστών της. Τέλος, ενώ αναμένεται αύξηση των ορμονών του θυρεοειδούς αυτή, δεν παρατηρείται [Stryer L. 1995].

γ) Σωματικές αντιδράσεις

Οι σωματικές αντιδράσεις για την κατάσταση A_2 περιλαμβάνουν την ολιγουρία, λόγω της έκκρισης της αντιδιουρητικής ορμόνης, την αύξηση του καρδιακού ρυθμού, την υποθερμία, την ελάττωση της κινητικότητας του εντερικού σωλήνα και την αναστολή της εφίδρωσης.

4.3 ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ Β

Η κατάσταση Β περιγράφει εγκλωβισμένους με έντονο στρες και σοβαρούς τραυματισμούς (πολυτραυματίας). Η κατάσταση του πολυτραυματία είναι συνυφασμένη με την ύπαρξη μόλυνσης, φλεγμονής και νεκρών κατεστραμμένων ιστών. Σε συνάρτηση με το χρόνο εγκλωβισμού διαχωρίζεται στις εξής επιμέρους περιπτώσεις:

❖ Κατάσταση B_1 (χρονική διάρκεια μέχρι 24 h)

Στην κατάσταση αυτή συνυπάρχουν δύο φάσεις με διαφορετικό συντελεστή βαρύτητας η καθεμία. Αυτές είναι η φάση Ebb, η οποία περιγράφεται στην κατάσταση A_1 , και η φάση του υπερμεταβολισμού, η οποία θα περιγραφεί στη συνέχεια. Για τις πρώτες 2h περίπου, η φάση με τον μεγαλύτερο συντελεστή βαρύτητας είναι αυτή του υπερμεταβολισμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι εξαιτίας της ύπαρξης τραυματισμού η φάση Ebb στην κατάσταση B_2 διαρκεί πολύ λιγότερο σε σχέση με την κατάσταση A_1 . Συχνά ο τραυματισμός μπορεί να είναι τόσο σοβαρός ώστε η φάση Ebb, η οποία συνυπάρχει με τη φάση του υπερμεταβολισμού, να διαρκέσει πολύ λιγότερο από 2h και μέσα στα πρώτα 10 λεπτά να επικρατήσει η φάση του υπερμεταβολισμού έναντι της φάσης Ebb.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η κατάσταση B_1 περιλαμβάνει τις νευροενδοκρινικές, μεταβολικές και σωματικές αντιδράσεις τόσο της φάσης Ebb όσο και της φάσης του

υπερμεταβολισμού. Αυτές περιγράφονται παρακάτω [Frayn K.N. 1986, Inoue-Sakurai C. et al. 2000]:

I. Φάση Ebb στην κατάσταση B₁

α) Νευροενδοκρινικές αντιδράσεις

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην κατάσταση A₁, στην Ebb φάση ενεργοποιείται η περιοχή άμυνας του υποθαλάμου, διεγείρεται το συμπαθητικό σύστημα και εκκρίνονται ορμόνες της υπόφυσης, όπως ACTH, GH, PRL, ADH, με κύριο αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή κορτιζόλης. Από τις ορμόνες της υπόφυσης, η αντιδιουρητική ορμόνη ADH είναι πιο πιθανή για να σχετισθεί με τις μεταβολικές αλλαγές που έπονται, ενώ η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη σχετίζονται περισσότερο με τη ρύθμιση αυτών των αλλαγών. Εξαιτίας του τραυματισμού, όλες οι ενδοκρινικές αντιδράσεις, όπως αυτές περιγράφονται στην κατάσταση A₁, πραγματοποιούνται με ταχύτερο ρυθμό. Επιπλέον εκκρίνονται ουσίες από τους κατεστραμμένους ιστούς, εξαιτίας της μείωσης του όγκου (υποογκαιμία) και της πίεσης του αίματος (υπόταση), για παράδειγμα η AVP. Τέλος εκκρίνονται οσμο-, γλυκο-και υποδοχείς ορμονών, εξαιτίας της αλλαγής της σύστασης του αίματος [Cerra F. 1987, Iskit H.S. et al. 2001]

β) Μεταβολικές αντιδράσεις

Η Ebb φάση στον τραυματισμό συνεπάγεται την κινητοποίηση όλων των αποθηκών καυσίμων, όπως είναι το γλυκογόνο και η τριακυλογλυκερόλη. Η πιο πιθανή ορμόνη που ενεργοποιεί τις αποθήκες της τριακυλογλυκερόλης είναι η αδρεναλίνη. Αντίθετα, η δράση της κορτιζόλης απαιτεί την επαγωγή πρωτεϊνοσύνθεσης, επομένως συγκρατεί παρά κινητοποιεί τις αποθήκες καυσίμων. Επίδραση φαίνεται να έχει και η αυξητική ορμόνη, τα ποσοστά της οποίας είναι αυξημένα μετά από τραυματισμό.

Πολλές από τις ορμόνες που εκκρίνονται στα αρχικά στάδια πριμοδοτούν τη λιπόλυση και τη γλυκογονόλυση. Η λιπόλυση πραγματοποιείται αμέσως μετά τον τραυματισμό. Παρόλα αυτά τα επίπεδα των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο πλάσμα είναι πολύ μικρά. Γλυκογονόλυση παρατηρείται κυρίως στους μύες και προκαλείται από της δράσης της αδρεναλίνης. Η γλυκογονόλυση στους μύες έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση γαλακτικού και πυροσταφυλικού οξέος, τα οποία μετατρέπονται σε γλυκόζη στο ήπαρ. Παρατηρείται γενικά διέγερση της ηπατικής νεογλυκογένεσης, η οποία οφείλεται τόσο στη απελευθέρωση του γαλακτικού οξέος όσο και στη γλυκερόλη, που απελευθερώνεται από το λιπώδη ιστό. Ορμόνες, όπως η αδρεναλίνη κατά κύριο λόγο, η κορτιζόλη και η γλυκαγόνη, δρουν συνεργατικά για να πριμοδοτήσουν την αύξηση της γλυκόζης, οπότε παρατηρείται υπεργλυκαιμία.

Η κινητοποίηση των καυσίμων βρίσκεται στην αιχμή της γύρω στις 1-2 h μετά τον τραυματισμό, όπου αρχίζει να επικρατεί η φάση του υπερμεταβολισμού. Παρόλα αυτά, τα χαρακτηριστικά της φάσης Ebb διατηρούνται για αρκετό χρόνο ακόμα. Έτσι, παρόλο που τα αποθέματα του ηπατικού γλυκογόνου έχουν εξαντληθεί, παρατηρείται εμμονή της υπεργλυκαιμίας. Αυτό οφείλεται στο ότι συνεχίζεται η γλυκονογένεση στο ήπαρ και στο ότι δε γίνεται εκμετάλλευση της περιφερειακής γλυκόζης, αφενός γιατί η ινσουλίνη δεν παρουσιάζει έντονη μεταβολική δράση και αφετέρου γιατί αυτή η δράση παρεμποδίζεται από την αδρεναλίνη [Frayn K.N. 1986, Cerra F. 1987, Iskit H.S. et al. 2001].

γ) Σωματικές αντιδράσεις

Παρατηρείται μείωση της πίεσης του αίματος, δηλαδή υπόταση. Άλλα συμπτώματα είναι η απάθεια προς το περιβάλλον, η μείωση της αίσθησης του πόνου, πιθανή λιποθυμία και ολιγουρία εξαιτίας της δράσης της ADH [Frayn K.N. 1986]

II. Φάση υπερμεταβολισμού στην κατάσταση B₁

α) Νευροεδοκρινικές αντιδράσεις

Λαμβάνει χώρα έκλυση ιστικών παραγόντων από τα τραύματα που επιδρούν αφενός στην περαιτέρω έκκριση κατεχολαμινών από τα επινεφρίδια, ρενίνης από τους νεφρούς και αγγειοτενσίνης από τους νεφρούς και τους πνεύμονες, και αφετέρου στην αύξηση της γλυκαγόνης, λόγω των κατεχολαμινών, και στη μείωση της ινσουλίνης, λόγω των κυτοκινών. Οι ιστικοί παράγοντες που συμμετέχουν στη διαδικασία ενεργοποίησης του μεταβολισμού του πολυτραυματία μπορεί να είναι χημικοί παράγοντες, κυτταροκίνες ή παράγωγα του αραχιδονικού οξέος και αναλύονται παρακάτω, στην κατάσταση B₂ [Frayn K.N. 1986, Cerra F. 1987]

β) Μεταβολικές αντιδράσεις

Λαμβάνει χώρα μεγάλη κινητοποίηση του ενεργειακού υποστρώματος. Παρατηρείται υπεργλυκαιμία λόγω νεογλυκογέννεσης, αύξηση του πυροσταφυλικού και του γαλακτικού οξέος εφόσον το τραύμα αποτελεί υπόστρωμα νεογλυκογέννεσης, καθώς και αύξηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων και αμινοξέων, όπως της λευκίνης και της ισολευκίνης αρχικά και της αλανίνης αργότερα. Επίσης παρατηρείται αύξηση της γλυκερόλης και των κετοσωμάτων [Atali C.B. 1987, Mills F.J. et al. 1985]

γ) Σωματικές αντιδράσεις

Παρατηρείται ταχύπνοια με αποτέλεσμα την παραγωγή CO₂. Άλλα συμπτώματα είναι η ταχυκαρδία, η ολιγουρία, η θόλωση της διάνοιας, η λευκοκυττάρωση, δηλαδή αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων, που αποτελεί ένδειξη λοιμώξεως, η υποξία, δηλαδή η πτώση της μερικής πίεσης του οξυγόνου του αίματος [Frayn K.N. 1986, Cerra F. 1987]

❖ Κατάσταση B₂ ή φάση “flow” (χρονική διάρκεια μεγαλύτερη από 24h)

Η φάση flow είναι η φάση του σταθερού υπερμεταβολισμού. Η έναρξη του υπερμεταβολισμού μπορεί να οφείλεται σε μεμονωμένη ή πολυοργανική ανεπάρκεια. Στην περίπτωση των εγκλωβισμένων, επειδή οι τραυματισμοί είναι πολλαπλοί και ιδιαίτερα σοβαροί, παρατηρείται το φαινόμενο της πολυοργανικής ανεπάρκειας [Frayn K.N. 1986, Cerra F. 1987]. Το αμέσως επόμενο στάδιο, αν δεν υπάρξει ανάνηψη, είναι ο θάνατος. Οι νευροεδοκρινικές, μεταβολικές και σωματικές αντιδράσεις που περιγράφουν την κατάσταση flow είναι τόσο αυτές που περιγράφουν τη φάση του υπερμεταβολισμού της κατάστασης B₁, όσο και οι παρακάτω :

α) Νευροενδοκρινικές αντιδράσεις

Όλοι οι ιστικοί παράγοντες της κατάστασης Β₁ είναι πλήρως ενεργοποιημένοι και εκλύονται από τους κατεστραμμένους ιστούς, τις ενδοτοξίνες του τραύματος και τα βακτηρίδια. Οι παράγοντες αυτοί συμβάλλουν στην έκλυση και στην ενεργοποίηση κάποιων προϊόντων, τα οποία κυκλοφορούν στο αίμα. Αυτά τα προϊόντα είναι:

-Χημικοί παράγοντες

Τέτοια είναι τα συμπληρώματα C3a, C5a που συμβάλλουν στην πήξη του αίματος.

-Κυτταροκίνες

Η ιντερλευκίνη-1 (IL-1), ευθύνεται πρώτον για τη σύνθεση πυρετογόνων ουσιών (EP) που δρουν στον υποθάλαμο και δημιουργούν υπερπηξία. Δεύτερον είναι ο υπεύθυνος παράγοντας για τη διέγερση του ήπατος και την παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσεως (LEM). Τρίτον συντελεί στη διέγερση του ανοσολογικού συστήματος (LAM) και τέταρτον ενεργοποιεί το μηχανισμό σύνθεσης των προσταγλανδινών. Ο παράγοντας νέκρωσης των κυττάρων TNF συμβάλλει στην παραγωγή β-ενδορφινών. Άλλες κυτταροκίνες είναι η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και η γ-ιντερφερόνη (INF-γ).

-Παράγωγα του αραχιδονικού οξέος

Τέτοια παράγωγα είναι οι θρομβοξάνες B₂ (TBX₂), οι προσταγλανδίνες της PGE₂ που οδηγούν σε ανοσοκαταστολή, δηλαδή καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, και τα λευκοτριένια που προκαλούν καρδιακή ανεπάρκεια.

β) Μεταβολικές αντιδράσεις

Παρατηρείται αύξηση του μεταβολικού ρυθμού 1,5 έως 2 φορές σε σχέση με το πρώτο 24ωρο και γενικά μεγάλη κινητοποίηση του ενεργειακού υποστρώματος. Εξαιτίας της διαβητογόνου δράσης των αυξημένων επιπέδων της κορτιζόλης, των κατεχολαμινών, της αυξητικής ορμόνης και της γλυκαγόνης, παρατηρείται υπεργλυκαιμία. Η σταδιακά ανερχόμενη ινσουλίνη παραμένει αδρανής. Για τα αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης έχουν γίνει κάποιες παραδοχές, όπως ότι δεν περιορίζεται η έκκρισή της από τις αδρενεργικές ουσίες και ότι αναστέλλεται η αναβολική της δράση. Η επερχόμενη υπεργλυκαιμία μπορεί να οφείλεται κατά πρώτο λόγο στη νεογλυκογένεση, δηλαδή στην αποικοδόμηση λιπών και πρωτεϊνών και στη χρησιμοποίηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων, των αμινοξέων και του γαλακτικού οξέος για το σχηματισμό γλυκόζης. Κατά δεύτερο λόγο, η υπεργλυκαιμία μπορεί να οφείλεται στην παρεμπόδιση της εισόδου της γλυκόζης στο κύτταρο, και κατά τρίτο λόγο μπορεί να οφείλεται στη γλυκογονόλυση, εξαιτίας της εξάντλησης των αποθεμάτων.

Επίσης παρατηρείται αύξηση του γαλακτικού οξέος του αίματος λόγω αυξημένης γλυκόλυσης στους μυς, γιατί η παροχή αίματος ή οξυγόνου είναι ελλιπής. Η αναερόβια γλυκόλυση οδηγεί σε παραγωγή γαλακτικού και πυροσταφυλικού οξέος, τα οποία ή καίγονται όπως είναι ή μετατρέπονται στο ήπαρ σε γλυκόζη. Λαμβάνει χώρα διάσπαση των πρωτεϊνών σε αμινοξέα, λόγω δράσης της κορτιζόλης. Η διάσπαση των πρωτεϊνών καταλήγει σε αύξηση του πυροσταφυλικού οξέος, της ουρίας και των παραγώγων του αζώτου στο αίμα και στα ούρα. Επίσης παρατηρείται λιπόλυση με συνέπεια την αύξηση των λιπαρών οξέων.

Η αύξηση των κετονοσωμάτων, δηλαδή της ακετόνης, του β-υδροξυβουτυρικού οξέος και του ακετοξικού οξέος είναι ιδιαίτερα σημαντική. Τα κετοσώματα παράγονται λόγω του έντονου καταβολισμού των λιπών και των αμινοξέων, με αποτέλεσμα υπερβολική συσσώρευση Acetyl-CoA, αδυναμία οξειδώσής του και εκτροπής του αρχικά σε ακετοξικό οξύ και στη συνέχεια σε β-υδροξυβουτυρικό, τα οποία επίσης χρησιμεύουν ως καύσιμα. Από τα κετοσώματα μόνο η ακετόνη δεν είναι μεταβολίσιμο προϊόν και είναι το πιο πτητικό.

Επιπλέον παρατηρείται υπερκαλιαιμία, υπονατρίαμια και υπερασβεστιαμία καθώς επίσης και αύξηση τρανσαμινών όπως είναι οι SGOT, SGPT, που εκκρίνονται από το ήπαρ. Τέλος παρατηρείται αύξηση της μυοσφαιρίνης και της κρεατινινικής φωσφορικής κινάσης CPK, που εκκρίνονται στους μύες [Σέχα Μ., 1988].

γ) Σωματικές αντιδράσεις

Στη φάση flow τα συμπτώματα είναι υπέρπνοια, αύξηση του καρδιακού ρυθμού, υπερθερμία αρχικά και με την πάροδο του χρόνου υποθερμία, ελάττωση της κινητικότητας του εντερικού σωλήνα, αναστολή της εφίδρωσης, ολιγουρία, υπόταση, απώλεια των αισθήσεων και λιποθυμία. Σε κλινικό επίπεδο η εμφάνιση πυρετού, υπνηλίας, λευκοκυττάρωσης προειδοποιεί για τη συνύπαρξη σηψαιμίας [Σέχα Μ., 1988].

4.4 ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ Γ

Η κατάσταση Γ αναφέρεται σε εγκλωβισμένους, οι οποίοι είναι νεκροί. Ο θάνατος ενός εγκλωβισμένου μπορεί να επέλθει άμεσα ή μετά από κάποιο χρόνο. Στην πρώτη περίπτωση αιτία θανάτου μπορεί να είναι έμφραγμα του μυοκαρδίου, ασφυξία από κατάκωση, δηλαδή απόφραξη της αναπνευστικής οδού από την εισπνεόμενη σκόνη που δημιουργείται κατά την κατάρρευση του κτιρίου, κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις από πλήξη με οικοδομικά υλικά, εσωτερική αιμορραγία, δηλητηρίαση με CO₂ όταν δεν υπάρχουν δίοδοι για να εισέλθει οξυγόνο στο χώρο του εγκλωβισμένου [Tanaka H. et al. 1999, Papadopoulos I.N. et al. 2004, Nakamori Y. et al. 1997, Stalnikowicz R. et al. 2002].

Η δηλητηρίαση με CO₂ δεν οφείλεται στην άμεση δράση του, αλλά στις ανοξυγοναιμικές συνθήκες που δημιουργούνται λόγω αντίστοιχης μείωσης της συγκέντρωσης του οξυγόνου στον εισπνεόμενο αέρα. Θεωρείται ότι είναι αδύνατη η παραμονή σε χώρο που περιέχει CO₂ σε συγκέντρωση 4-5% περισσότερο από 9-10 min, εφόσον προκαλείται δύσπνοια, κεφαλαλγία, ίλιγγοι καθώς και νευροψυχιατρικές διαταραχές. Σε συγκέντρωση CO₂ 20-30% επέρχεται ταχέως απώλεια συνειδήσεως και οριστική απώλεια των αισθήσεων, ενώ σε συγκέντρωση 40% ο θάνατος επέρχεται ακαριαία και οφείλεται σε παράλυση του κέντρου της αναπνοής. Άλλα τοξικά αέρια που μπορούν να έχουν ασφυξιογόνο δράση είναι το CO και το μεθάνιο [Ku wagata Y. et al. 1997].

Στη δεύτερη περίπτωση, όπου ο εγκλωβισμένος πεθαίνει μετά από κάποιο χρόνο από τη στιγμή του εγκλωβισμού του, αιτίες θανάτου μπορούν να είναι η αφυδάτωση και η ασιτία. Επίσης κακώσεις που αρχικά δεν ήταν θανατηφόρες μπορεί λόγω της παρατεταμένης παραμονής του εγκλωβισμένου στα συντρίμια να αποβούν τελικά θανατηφόρες. Άλλη αιτία θανάτου είναι το λεγόμενο σύνδρομο καταπλάκωσης ή crush syndrome, όπου ανάλογα με το μέρος του σώματος που έχει καταπλακωθεί

καθορίζεται και ο χρόνος στον οποίο ο εγκλωβισμένος απεβιώνει [Osdogan S. et al. 2001]

Οι νευροενδοκρινικές, μεταβολικές και σωματικές αντιδράσεις που περιγράφουν την κατάσταση Γ είναι :

α) Νευροενδοκρινικές αντιδράσεις

Όσον αφορά τις ορμόνες, παρατηρείται αύξηση της επινεφρίνης μετά το θάνατο και μείωση της θυροξίνης. Η κορτιζόλη του ορού μετά το θάνατο βρέθηκε να ανταποκρίνεται σε τιμές που λαμβάνονται κατά τη διάρκεια της ζωής και οι οποίες είναι σταθερές για τον “εγγύς” από τη στιγμή του θανάτου χρόνο. Περισσότερο σταθερές φαίνονται οι συγκεντρώσεις της TSH, ενώ τα επίπεδα των 17-υδροξυκορτικοστεροειδών και της αυξητικής ορμόνης αυξάνουν καταφανώς.

β) Μεταβολικές αντιδράσεις

Η αποικοδόμηση της οργανικής ζώσας ύλης αρχίζει αμέσως μετά το θάνατο. Πραγματοποιείται αποικοδόμηση των πρωτεϊνών με την επίδραση ορισμένων ενζύμων, όμως αυτή η πρωτεόλυση δεν ακολουθεί σταθερό ρυθμό σε ολόκληρο το σώμα. Συνέπεια της πρωτεόλυσης είναι η παραγωγή φαινολών, CO₂, H₂S, NH₃ και CH₄. Επίσης λαμβάνει χώρα υδρόλυση των ουδέτερων λιπών με αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων καθώς και αποικοδόμηση των υδατανθράκων προς CO₂ και H₂O. Παρατηρείται αύξηση της NH₃ και των αζωτούχων βάσεων στο αίμα και μείωση της συγκέντρωσης του Na⁺ και του Cl⁻, με ρυθμό περίπου 1mEq/l/h. Σημειώνεται ότι όσο μεγαλώνει ο χρόνος που πέρασε από το θάνατο, οι τιμές του K⁺ στο αίμα αυξάνονται, ενώ αντίθετα οι τιμές του Na⁺ και του Cl⁻ είναι δυνατό να μειωθούν.

Οι συγκεντρώσεις του ανόργανου και του οργανικού φωσφόρου αυξάνουν με ταχύ ρυθμό μετά θάνατον, ενώ αισθητή είναι η μείωση των εστέρων της χοληστερόλης στο αίμα λόγω της δράσης των εστερασών του ορού.

γ) Σωματικές αντιδράσεις

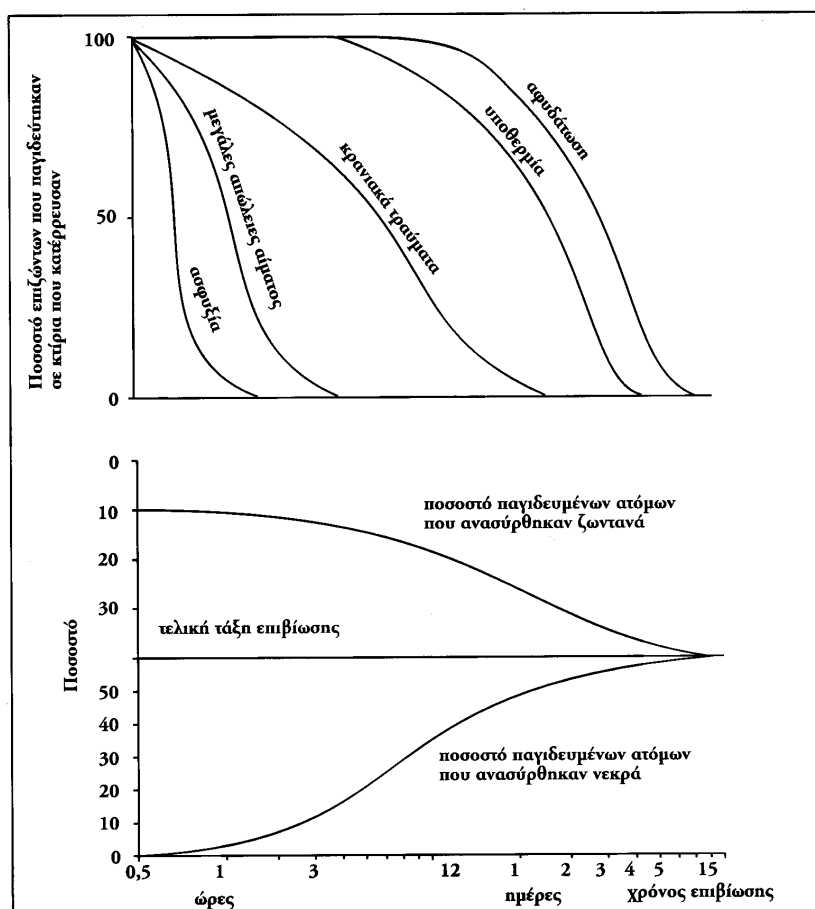
Τα πρώτα σημεία θανάτου που εμφανίζονται στο θύμα είναι η παύση των ζωτικών λειτουργιών της αναπνοής και της κυκλοφορίας. Παρατηρείται μυϊκή χάλαση, απώλεια των αισθήσεων, διάνοιξη των βλεφάρων, απώλεια ούρων και κοπράνων [Κουτσελίνης Α., 1991].

4.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΜΕ ΤΙΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΕΝΩΝ

Για τους εγκλωβισμένους της κατάστασης Α, δηλαδή γι' αυτούς που έχουν στρες χωρίς ή με λίγες κακώσεις, και τους εγκλωβισμένους της κατάστασης Β, δηλαδή για τους πολυτραυματίες, η μετάβαση στην κατάσταση Γ είναι ζήτημα χρόνου αν δεν εντοπισθούν έγκαιρα από τα συνεργεία διάσωσης.

Σχεδόν το 50% των ατόμων που έχουν υποστεί κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις πεθαίνει μέσα σε 24 ώρες, ενώ όσοι έχουν εξωτερικές πληγές ή εσωτερική αιμορραγία και δε δεχτούν άμεση ιατρική περίθαλψη συνήθως απεβιώνουν [Olson R.S. et al 1987, Jones P. 1997]

Έχει βρεθεί ότι το να είναι κάποιος εγκλωβισμένος κάτω από τα ερείπια, αυξάνει την πιθανότητα να είναι τραυματισμένος στο πενταπλάσιο. Τα παγιδευμένα άτομα δυσκολεύονται να αναπνεύσουν εξαιτίας της υπερβολικής πίεσης που δέχονται στο θώρακα ή εξαιτίας της σκόνης που δημιουργείται από την κατάρρευση. Τόσο τα κτίρια με τοιχοποιία όσο και αυτά με οπλισμένο σκυρόδεμα μπορούν να παράγουν κατά την κατάρρευσή τους τεράστια ποσότητα σκόνης, που μπορεί να προκαλέσει ασφυξία με αποτέλεσμα το θάνατο. Μόνο 2-6 ώρες μετά το σεισμό, το ποσοστό των εγκλωβισμένων που αναμένεται να είναι ακόμα ζωντανοί είναι μικρότερο από 50%.



Σχήμα 4.1 : Χρόνος επιβίωσης για τους εγκλωβισμένους στα ερείπια

Αυτοί που δεν έχουν υποκύψει στα τραύματά τους μπορεί να πεθάνουν από ισχυρό ψυχικό στρες ή υποθερμία μετά περίπου από 48 ώρες, ενώ υπάρχουν λίγες περιπτώσεις ατόμων που έχουν απεγκλωβισθεί ζωντανοί μετά από 48 ώρες. Τα παγιδευμένα άτομα που δεν έχουν τραυματισθεί μπορεί να πεθάνουν, αρκετά γρήγορα από αφυδάτωση. Τα θύματα που έχουν τραυματισθεί πρέπει να διατηρούνται ζεστά και τα σπασμένα μέλη τους να παραμένουν ακίνητα σε νάρθηκα, που φυσικά είναι αδύνατο να συμβεί κάτι τέτοιο όσο βρίσκονται κάτω από τα ερείπια. Επίσης, οι ηλικιωμένοι ή άτομα με ειδικές ανάγκες είναι λιγότερο πιθανό να καταφέρουν να επιβιώσουν κάτω από τόσο αντίξοες συνθήκες. Στο Σχ. 4.1 φαίνεται η σχέση μεταξύ χρόνου και επιβίωσης σε περιπτώσεις παγιδευμένων ατόμων.

Με βάση το Σχ. 4.1 λοιπόν παρατηρούμε ότι ο θάνατος από ασφυξία επέρχεται πολύ γρήγορα, δηλαδή το πολύ μέσα σε 2 ώρες από τη στιγμή του εγκλωβισμού. Από ασφυξία μπορεί να πεθάνουν εγκλωβισμένοι τόσο της κατάστασης Α όσο και της Β. Η περίπτωση εγκλωβισμένων με μεγάλες απώλειες αίματος μπορεί να περιγραφεί από την κατάσταση Β και η μετάβαση στην κατάσταση Γ διαρκεί το πολύ 2 ώρες ανάλογα με το μέγεθος της αιμορραγίας. Η περίπτωση εγκλωβισμένων με κρανιακά τραύματα μπορεί να περιγραφεί από την κατάσταση Β και η μετάβαση στην κατάσταση Γ διαρκεί το πολύ 2-3 ημέρες ανάλογα με τη σοβαρότητα των τραυμάτων. Στο σχήμα 2 φαίνεται ότι ο θάνατος από υποθερμία δεν είναι άμεσος αλλά επέρχεται το πολύ μετά από 10 μέρες, ενώ ο θάνατος από αφυδάτωση επέρχεται μετά από 15 μέρες. Αυτές οι δύο τελευταίες περιπτώσεις αφορούν εγκλωβισμένους της κατάστασης Α, γι' αυτό και η μετάβαση στην κατάσταση Γ δεν είναι άμεση.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στην πραγματικότητα ένας εγκλωβισμένος μπορεί να ανήκει στην κατάσταση Β, δηλαδή να έχει πολλαπλά τραύματα αλλά τελικά να πεθάνει από υποθερμία ή αφυδάτωση. Οι συνθήκες που δημιουργούνται μετά από ένα καταστροφικό σεισμό δεν μπορούν να προβλεφθούν με απόλυτη ακρίβεια, αλλά με τη συσχέτιση του χρόνου επιβίωσης με τις καταστάσεις των εγκλωβισμένων γίνεται μια οργανωμένη προσπάθεια για την προσέγγιση της πραγματικότητας.

4.6 ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

Λαμβάνοντας υπόψη τις νευροενδοκρινικές, τις βιοχημικές και τις σωματικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στις καταστάσεις Α, Β, Γ μπορεί να εκτιμηθεί σε ποιες ανθρώπινες εκκρίσεις αναμένεται να βρίσκεται το μεγαλύτερο ποσοστό των πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs).

Αυτή η ταξινόμηση είναι ιδιαίτερα χρήσιμη γιατί έτσι μπορεί να υπολογισθεί με ικανοποιητική ακρίβεια σε ποιες εκκρίσεις για κάθε κατάσταση εγκλωβισμού θα πρέπει να αναζητηθούν οι πτητικές οργανικές ουσίες που είναι χαρακτηριστικές για τον άνθρωπο και που μπορούν να είναι ανιχνεύσιμες από τα αναλυτικά όργανα. Σημειώνεται ότι οι περιπτώσεις που παρουσιάζονται στον πίνακα 4.1 είναι ανεξάρτητες από την τοπολογία του εγκλωβισμού.

Πίνακας 4.1: Καταστάσεις εγκλωβισμένων και σχετικές ανθρώπινες εκκρίσεις

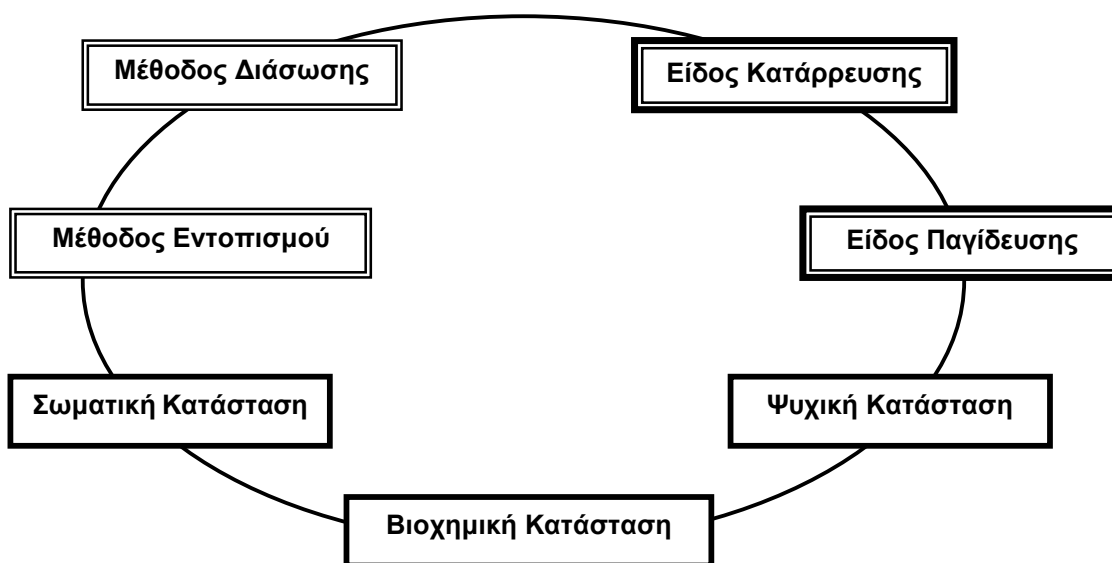
<p><u>ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ A₁</u></p> <p>α) Διάρκεια εγκλωβισμού μέχρι 24h β) Χωρίς σοβαρές κακώσεις γ) Έντονο στρες</p>	<p>Εκκρίσεις που ενδιαφέρουν και περιέχουν πτητικές οργανικές ουσίες:</p> <p>α) Κατά κύριο λόγο ούρα (έντονα) β) Κατά δεύτερο λόγο εκπνεόμενος αέρας</p> <p>Πιθανές βιοχημικές αντιδράσεις:</p> <p>α) Αύξηση ελεύθερων λιπαρών οξέων β) Αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων γ) Αύξηση ελαφρώς γλυκόζης δ) Εκπομπή κετοσωμάτων από την αναπνοή</p>
<p><u>ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ A₂</u></p> <p>α) Διάρκεια εγκλωβισμού μεγαλύτερη από 24h β) Χωρίς σοβαρές κακώσεις γ) Έντονο στρες</p>	<p>Εκκρίσεις που ενδιαφέρουν και περιέχουν πτητικές οργανικές ουσίες:</p> <p>α) Κατά κύριο λόγο εκπνεόμενος αέρας β) Κατά δεύτερο λόγο ούρα</p> <p>Πιθανές βιοχημικές αντιδράσεις:</p> <p>α) Αύξηση ελεύθερων λιπαρών οξέων β) Αυξημένη παραγωγή γλυκόζης (υπεργλυκαιμία) γ) Αύξηση του γαλακτικού οξέος στο αίμα δ) Αύξηση της NH₃ ε) Αυξημένη εκπομπή κετοσωμάτων από την αναπνοή στ) Υπερκαλιαιμία ζ) Υπονατριαιμία</p>

<p><u>ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ B₁</u></p> <p>α) Διάρκεια εγκλωβισμού μέχρι 2h (Φάση Ebb και φάση υπερμεταβολισμού)</p> <p>β) Σοβαρές Κακώσεις</p> <p>γ) Έντονο στρες</p>	<p>Εκκρίσεις που ενδιαφέρουν και περιέχουν πτητικές οργανικές ουσίες:</p> <p>α) Κατά κύριο λόγο εκπνεόμενος αέρας β) Κατά δεύτερο λόγο αίμα γ) Κατά τρίτο λόγο ούρα και ιδρώτας (πολύ μικρές ποσότητες).</p> <p>Πιθανές βιοχημικές αντιδράσεις:</p> <p>α) Λιπόλυση β) Υπεργλυκαιμία γ) Διάσπαση της τριακυλογλυκερόλης δ) Αύξηση της αυξητικής ορμόνης</p>
<p><u>ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ B₁</u></p> <p>α) Διάρκεια εγκλωβισμού μεγαλύτερη από 2h και μικρότερη από 24h (Φάση υπερμεταβολισμού και φάση Ebb)</p> <p>β) Σοβαρές Κακώσεις</p> <p>γ) Έντονο στρες</p>	<p>Εκκρίσεις που ενδιαφέρουν και περιέχουν πτητικές οργανικές ουσίες:</p> <p>α) Κατά κύριο λόγο εκπνεόμενος αέρας β) Κατά δεύτερο λόγο αίμα γ) Κατά τρίτο λόγο ούρα (ελάχιστα)</p> <p>Πιθανές βιοχημικές αντιδράσεις :</p> <p>α) Έκλυση ιστικών παραγόντων β) Υπεργλυκαιμία γ) Αύξηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων δ) Αύξηση γλυκερόλης ε) Αύξηση των κετοσωμάτων</p>

<p><u>ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ Β₂</u></p> <p>α) Διάρκεια εγκλωβισμού μεγαλύτερη από 24h (Φάση υπερμεταβολισμού ή φάση flow) β) Σοβαρές Κακώσεις</p>	<p>Εκκρίσεις που ενδιαφέρουν και περιέχουν πτητικές οργανικές ουσίες:</p> <p>α) Κατά κύριο λόγο εκπνεόμενος αέρας β) Κατά δεύτερο λόγο αίμα γ) Κατά τρίτο λόγο ούρα (ελάχιστα)</p> <p>Πιθανές βιοχημικές αντιδράσεις:</p> <p>α) Πλήρης ενεργοποίηση των ιστικών παραγόντων β) Διπλασιασμός του μεταβολικού ρυθμού σε σχέση με το πρώτο 24ωρο γ) Υπεργλυκαιμία δ) Αύξηση των λιπαρών οξέων ε) Αύξηση των κετοσωμάτων στ) Λευκοκυττάρωση ζ) Υπερκαλιαιμία η) Υπονατρίαση</p>
<p><u>ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ Γ</u></p> <p>Θάνατος και έναρξη σήψης</p>	<p>Εκκρίσεις που ενδιαφέρουν και περιέχουν πτητικές οργανικές ουσίες:</p> <p>α) Κατά κύριο λόγο αίμα β) Κατά δεύτερο λόγο ούρα (ελάχιστα)</p> <p>Πιθανές βιοχημικές αντιδράσεις:</p> <p>α) Αποικοδόμηση οργανικής ζώσας ύλης (πρωτεϊνών και υδατανθράκων) β) Παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων γ) Παραγωγή φαινολών, CO₂, H₂S, NH₃ και CH₄ δ) Αύξηση του K⁺ στο αίμα</p>

4.7 ΚΥΚΛΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΔΙΑΣΩΣΗΣ

Η ψυχική, η βιοχημική και η σωματική κατάσταση ενός εγκλωβισμένου, εξαρτώνται από το είδος κατάρρευσης του κτηρίου και από το είδος της παγίδευσης του. Οι καταστάσεις αυτές καθορίζουν την προσπάθεια διάσωσης (εντοπισμός και διάσωση). Όλα τα προηγούμενα λοιπόν μπορούν να συνδυαστούν σε ένα ενιαίο κύκλο, ο οποίος αποτελείται από καταστάσεις και διαδικασίες που βρίσκονται σε ισορροπία όπως φαίνεται στο Σχ. 4.2. Μεταβολή σε ένα μέρος του κύκλου επηρεάζει όλα τα άλλα μέρη.



Σχήμα 4.2: Κύκλος εντοπισμού και διάσωσης εγκλωβισμένων.

Σύμφωνα με τον κύκλο αυτό, το είδος κατάρρευσης καθορίζει το είδος παγίδευσης και αυτό με τη σειρά του επιδρά στη διαμόρφωση της ψυχικής κατάστασης του εγκλωβισμένου, η οποία καθορίζει τη βιοχημική και σωματική κατάσταση του εγκλωβισμένου. Με βάση λοιπόν την κατάσταση αυτή επιλέγεται τόσο η μέθοδος εντοπισμού όσο και η μέθοδος διάσωσης.

Η χρησιμότητα αυτού του κύκλου είναι προφανής εφόσον βοηθά στη συσχέτιση της κατάστασης του εγκλωβισμένου τόσο με τις προσπάθειες διάσωσης όσο και με την τοπολογία και το είδος κατάρρευσης, όπως φαίνεται και στο Σχ. 4.2.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΟΝΑΔΑΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΚΡΟΦΗΣΗΣ (TDU)

5.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΜΟΝΑΔΑΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΚΡΟΦΗΣΗΣ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ

5.1.1. Αρχική Έκδοση Μονάδας Θερμικής Εκρόφησης

Η μονάδα θερμικής εκρόφησης που έχει χρησιμοποιηθεί για τις αρχικές σειρές πειραμάτων (Α και Β σειρά μετρήσεων) έχει κατασκευαστεί από το εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Ε.Μ.Π. Η μονάδα είναι ένα module που προσαρμόζεται σε σταθερό όργανο πάγκου, GC/MS. Σκοπός του είναι η εισαγωγή οργανικών ενώσεων, που έχουν παγιδευτεί μέσα σε προσροφητική παγίδα, στο GC/MS με την μορφή ενός ταχύτατου παλμού. Η εκρόφηση των οργανικών ενώσεων από την προσροφητική παγίδα γίνεται με θέρμανση αυτής. Το στάδιο αυτό είναι αργό, με αποτέλεσμα τα μόρια που εκροφούνται να δίνουν μια πεπλατυσμένη κορυφή αν εισέρχονταν κατευθείαν στο GC/MS. Γι' αυτό τον λόγο, μετά το στάδιο της θερμικής εκρόφησης ακολουθεί ένα στάδιο ψυχρής παγίδευσης των οργανικών ενώσεων που επιτυγχάνεται με την βοήθεια της κρυοπαγίδας και του υγρού άζωτου. Μετά το τέλος της ψυχρής επανεστίασης (cryofocusing) η ψυχρή παγίδα (κρυοπαγίδα) θερμαίνεται ταχύτατα απελευθερώνοντας έτσι τις οργανικές ενώσεις με πολύ μεγάλο ρυθμό. Αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι η είσοδος των VOCs στο GC/MS με τρόπο ανάλογο, με αυτόν μιας τυπικής ένεσης (injection) στο GC.

Η παροχή του απαιτούμενου φέροντος αερίου μέσα στην συσκευή γίνεται από το επάνω μέρος της συσκευής μέσω ενός εισαγωγέα χρωματογραφίας. Με αυτόν τον τρόπο υπάρχει η δυνατότητα των απευθείας ενέσεων υγρών προτύπων με την διάτρηση του septum που βρίσκεται στην κορυφή του εισαγωγέα. Η σύνδεση με την παροχή του αερίου από την φιάλη γίνεται με έτοιμη υποδοχή.

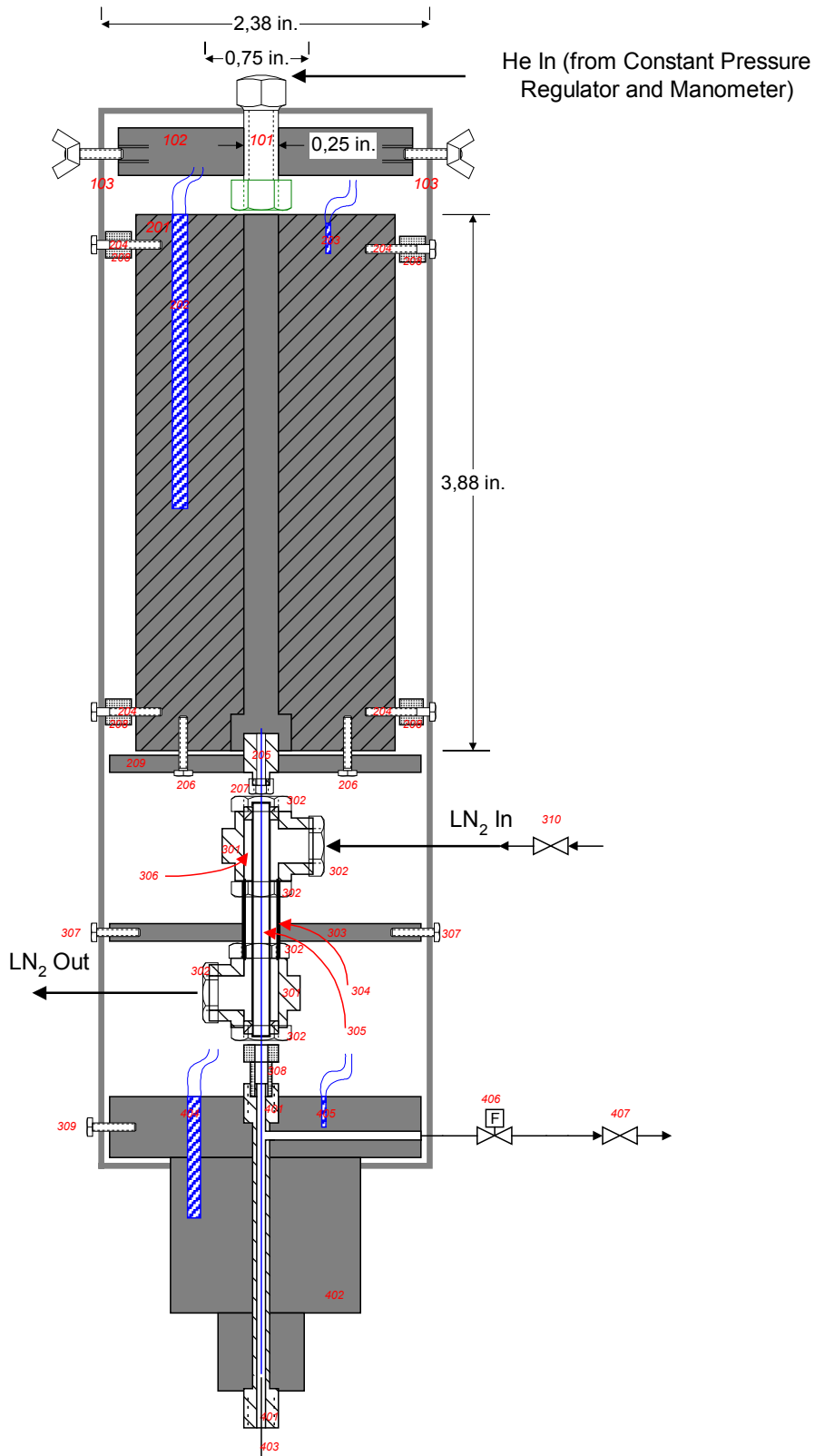
Μετά τον χρωματογραφικό εισαγωγέα ακολουθεί ένα μπλοκ αλουμινίου που έχει διπλό ρόλο. Αφενός στηρίζει τον εισαγωγέα, αφετέρου υποδέχεται τις προσροφητικές παγίδες για το στάδιο της θερμικής εκρόφησης. Αποτελείται από 2 κομμάτια αλουμινίου χαραγμένα σε σχήμα ημικυλινδρικό ώστε η ένωση τους να μπορεί να περιέχει την προσροφητική παγίδα. Η θέρμανση του μπλοκ γίνεται με θερμαντική αντίσταση.

Το φέρον αέριο (He) παρασύρει τις οργανικές ουσίες που απελευθερώνονται λόγω θέρμανσης από την προσροφητική παγίδα και τις μεταφέρει στο 3^ο μέρος της συσκευής που είναι η ψυχρή παγίδα. Αυτή είναι μια απενεργοποιημένη τριχοειδής στήλη (deactivated capillary) 0.53mm i.d. (PN 305) η οποία έχει την δυνατότητα να συγκρατεί τις οργανικές ενώσεις μέσω ψύξης της με υγρό άζωτο. Το υγρό άζωτο εισέρχεται από το πάνω ελεύθερο άκρο της συνδεσμολογίας και εξέρχεται από το ανάλογο κάτω. Η ταχύτατη θέρμανση της ψυχρής παγίδας επιτυγχάνεται με την προσθήκη σωλήνα ανοξειδωτού χάλυβα ο οποίος περιβάλλει την τριχοειδή της ψυχρής παγίδευσης. Χαρακτηριστικό του σωλήνα αυτού είναι ότι έχει ελάχιστη ηλεκτρική αντίσταση και με μικρή διαφορά δυναμικού στα άκρα του τον διαπερνά πολύ μεγάλο ηλεκτρικό ρεύμα με αποτέλεσμα να πυρώνει ταχύτατα, θερμαίνοντας ταυτόχρονα την τριχοειδή της ψυχρής παγίδευσης. Με αυτό τον τρόπο η απελευθέρωση των οργανικών ενώσεων από την τριχοειδή γίνεται με πολύ μεγάλο ρυθμό.

Οι ενώσεις που απελευθερώνονται μεταφέρονται στην τριχοειδή του GC/MS μέσω του τμήματος 4. Πρόκειται για μπλοκ αλουμινίου με το πάνω μέρος του σε σχήμα ορθογωνίου παραλληλεπίπεδου (για να εφαρμόζει στο πλαίσιο αλουμινίου) και σχήμα κυλινδρικό με 2 διαβαθμίσεις διαμέτρου στο κάτω μέρος για να προσαρμόζει στην ειδική υποδοχή του αέριου χρωματογράφου για ανάλογα module. Η τριχοειδής του αέριου χρωματογράφου συνδέεται στο κάτω μέρος του (4) στην ανάλογη υποδοχή, ενώ ένα μικρό μέρος της είναι μέσα στο τμήμα 4, ακριβώς μέχρι την έξοδο της τριχοειδούς της ψυχρής παγίδας. Το μπλοκ θερμοστατείται, για να αποφευχθούν συμπυκνώσεις μορίων με μεγάλο σημείο ζέσεως, με την βοήθεια θερμοαντιστατικής αντίστασης. Τέλος, στο ορθογώνιο μέρος του τμήματος 4 υπάρχει τρύπα - έξοδος η οποία λειτουργεί σαν split.

Πίνακας 5.1: Περιγραφή και χαρακτηριστικά εξαρτημάτων αρχικής έκδοσης μονάδας θερμικής εκρόφησης

Part Number	Περιγραφή	Υλικό	Προδιαγραφές
101	Εισαγωγέας Χρωματογραφίας	Ανοξ. Χάλυβας	
102	Μπλοκ υποστήριξης εισαγωγέα	Αλουμίνιο	2x6x6 cm (ΥxΠxΜ)
103	Βίδες στήριξης, βίδωμα χειρός	Ανοξ. Χάλυβας	3.5 mm
201	Μπλοκ θέρμανσης παγίδας	Αλουμίνιο	7x5x3.5 cm (ΥxΠxΜ)
202	Αντίσταση θέρμανσης		220 V
203	Αισθητήρας θερμοκρασίας	Κεραμικό	Pt-100
204	Βίδες	Ανοξ. Χάλυβας	3.5 mm
205	Connector	Ανοξ. Χάλυβας	1/4" – 1/8"
206	Βίδες	Ανοξ. Χάλυβας	3.5 mm
207	1/8" Nut	Ανοξ. Χάλυβας	Swagelock type
208	Spacer	Κεραμικό	Θερμομονωτικό
301	1/4" Tee	Ανοξ. Χάλυβας	Swagelock type
302	1/4" Nut	Ανοξ. Χάλυβας	Swagelock type
303	Μπλοκ υποστήριξης ψυχρής παγίδας	Αλουμίνιο	1x6x6 cm (ΥxΠxΜ)
304	Σωλήνας σύνδεσης	Ανοξ. Χάλυβας	1/4" o.d.
305	Τριχοειδής ψυχρής παγίδας	Χαλαζίας	0.53 mm o.d. Deactivated
306	Σωλήνας θέρμανσης	Ανοξ. Χάλυβας	1/8" o.d.
307	Βίδες	Ανοξ. Χάλυβας	3.5 mm
308	1/4" Capillary nut	Ανοξ. Χάλυβας	Swagelock type
309	Βίδα	Ανοξ. Χάλυβας	3.5 mm
310	Βαλβίδα υγρού αζώτου	Ανοξ. Χάλυβας	220V
401	Εξάρτημα προσαρμογής σωλήνα & σύνδεσης	Ανοξ. Χάλυβας	1/4"
402	Μπλοκ σύνδεσης με GC/MS	Αλουμίνιο	
403	Τριχοειδής GC/MS	Χαλαζίας	
404	Αντίσταση θέρμανσης		220V
405	Αισθητήρας θερμοκρασίας	Κεραμικό	Pt-100
406	Restrictor ρύθμισης ροής	Ανοξ. Χάλυβας	
407	Βαλβίδα split	Ανοξ. Χάλυβας	24V



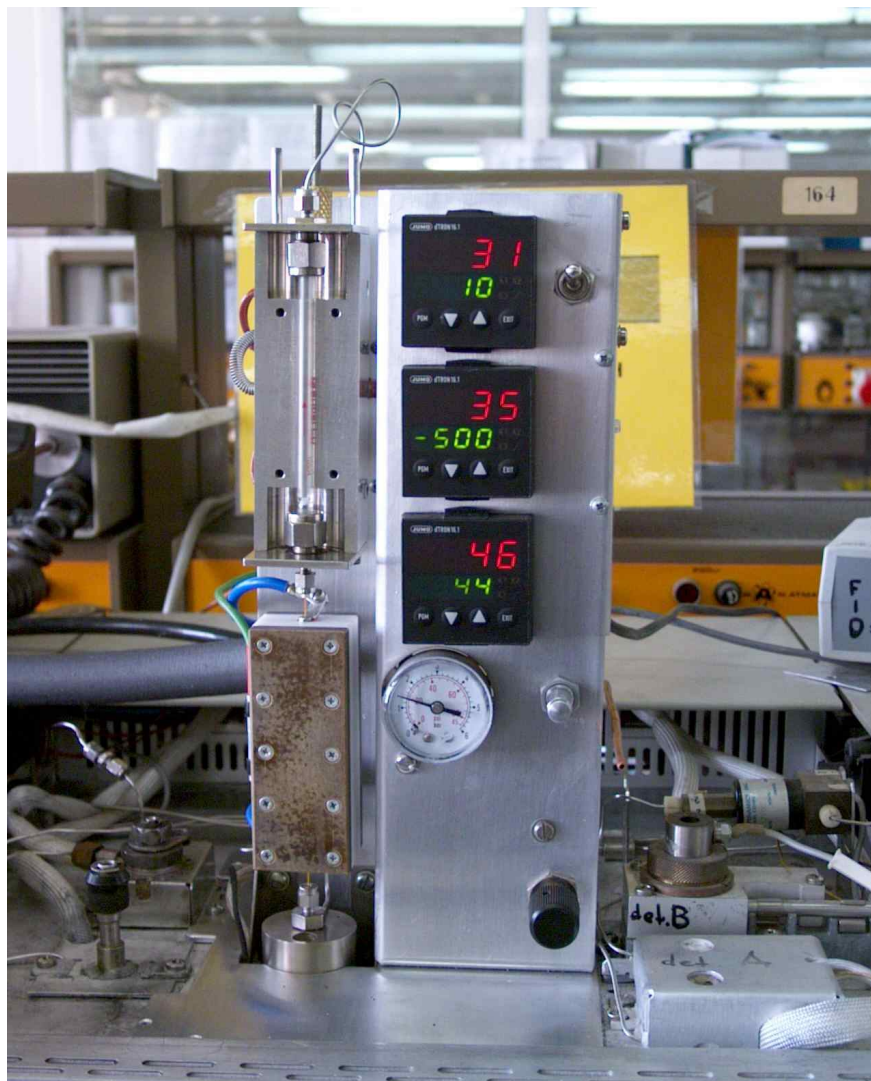
Σχήμα 5.1: Μηχανολογικό σχέδιο αρχικής έκδοσης Μονάδας Θερμικής Εκρόφησης

5.1.2 Βελτιωμένη έκδοση μονάδας θερμικής εκρόφησης

Στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2001 με τίτλο «Νέα τεχνολογία μέτρησης ρύπανση σε αστικό κι εργασιακό περιβάλλον» πραγματοποιήθηκε βελτίωση, τροποποίηση της μονάδας θερμικής εκρόφησης. Η νέα έκδοση εμφανίζει βελτιώσεις που σχετίζονται με τα εξής:

1. Χρήση υλικών σταθερών σε απότομες εναλλαγές της θερμοκρασίας για τα διάφορα τμήματα της μονάδας θερμικής εκρόφησης.
2. Βελτίωση του τμήματος υποδοχής των δειγμάτων, που προορίζονται για ανάλυση, στις προσροφητικές παγίδες, ώστε να γίνει πιο εργονομικό για πιο γρήγορη και ασφαλέστερη εναλλαγή των παγίδων που περιέχουν τα δείγματα.
3. Βελτίωση της θέρμανσης και της ψύξης των διαφόρων τμημάτων της μονάδας καθώς και του ελέγχου των θερμοκρασιών αυτών με χρήση κατάλληλων αντιστάσεων και ιδιαίτερα ευαίσθητων θερμοστοιχείων. Αυτό έχει σαν συνέπεια την μείωση του χρόνου της αναλυτικής διαδικασίας στα παρακάτω σημεία.
 - Θέρμανση του τμήματος εκρόφησης
 - Ψύξη και πολύ γρήγορη θέρμανση του συστήματος συλλογής των πτητικών (κρυοπαγίδα) μετά την εκρόφηση τους από τις παγίδες.
 - Θέρμανση τμήματος εισαγωγής στην χρωματογραφική στήλη του GC/MS.
4. Τροποποίηση συστήματος εισαγωγής προκειμένου, να έχει την δυνατότητα να δέχεται κατάλληλο πυρολυτικό σύστημα, για μεγαλύτερο εύρος επιλογών όσον αφορά τις εφαρμογές του και με έμφαση τις περιβαλλοντικές αναλύσεις.
5. Τοποθέτηση εξαρτημάτων ώστε να είναι δυνατός ο χειρονακτικός έλεγχος των διαφόρων τμημάτων της μονάδας θερμικής εκρόφησης προκειμένου για μεγαλύτερο έλεγχο της μονάδας.
6. Τροποποίηση λογισμικού που υποστηρίζει την μονάδα για πιο φιλική κι εύκολη χρήση αυτής.

Στο Σχ. 5.2 εμφανίζεται η βελτιωμένη έκδοση της μονάδας θερμικής εκρόφησης που χρησιμοποιήθηκε για τις επόμενες σειρές πειραμάτων (Γ και Δ). Η νέα έκδοση της μονάδας πριν την εφαρμογή της στις αναλύσεις δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα αξιολογήθηκε και αριστοποιήθηκαν οι παράμετροι που σχετίζονται με την διαδικασία ανάλυσης των δειγμάτων. Τα πειράματα υποδομής αναφέρονται στην συνέχεια.



Σχήμα 5.2: Νέα έκδοση μονάδας θερμικής εκρόφησης συζευγμένη με GC/MS

Τα τεχνικά χαρακτηριστικά της νέας έκδοσης της μονάδας θερμικής εκρόφησης παρουσιάζονται παρακάτω

ΔΙΑΣΤΑΣΕΙΣ: (36 cm) H x (14 cm) W x (17 cm) D

ΒΑΡΟΣ: 2,5 kgf

ΦΥΣΙΓΓΕΣ ΕΚΡΟΦΗΣΗΣ: 11,5 cm x 6 mm O.D x 4 mm ID

ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΚΡΟΦΗΣΗΣ : 40°C/min μέγιστος ρυθμός θέρμανσης
(DESORPTION HEATER)

ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΡΥΟΠΑΓΙΔΕΥΣΗΣ (Cryo-Focuser trap)

- (0,53 mm) ID x (19 cm) L
- Θέρμανση εξ επαγωγής, αντικαθίσταται η κρυοπαγίδα
- Υγρό άζωτο (για την ψύξη)
- 3°C/sec ρυθμός ψύξης
- 20°C/sec ρυθμός θέρμανσης

ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΣΤΗΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΤΗΛΗ (INJECTOR)

- Δυνατότητα λειτουργίας split/splitless
- Προσαρμογή liner
- Παλμική εισαγωγή δείγματος

ΕΥΡΥ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΩΝ

- Συστήματος θερμικής εκρόφησης: θερμ. περιβάλλοντος-230°C
- Σύστημα ψυχρής παγίδευσης: -180°C-300°C
- Σύστημα εισαγωγής χρωματ. στήλης: θερμ. περιβάλλοντος-300°C

5.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΥΠΟΔΟΜΗΣ ΜΟΝΑΔΑΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΚΡΟΦΗΣΗΣ

5.2.1 Αριστοποίηση Συνθηκών Λειτουργίας Διαφορετικών Τμημάτων της Μονάδας Θερμικής Εκρόφησης (TDU) για την Ανάλυση Εκπνεόμενου Αέρα

Προκειμένου για την χρήση της βελτιωμένης έκδοσης της μονάδας θερμικής εκρόφησης για αναλύσεις εκπνεόμενου αέρα ήταν απαραίτητη η ανάπτυξη μεθόδου ανάλυσης των VOCs προσαρμοσμένη στα νέα χαρακτηριστικά του οργάνου.

Η ανάπτυξη μεθόδου ανάλυσης βασίστηκε, σαν εκτίμηση, στις αρχικές συνθήκες ανάλυσης των δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα της παλαιότερης έκδοσης. Στην συνέχεια οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου για τα διάφορα τμήματα αριστοποιήθηκαν.

Τα πειράματα χωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες. Αυτά που αφορούσαν τις συνθήκες λειτουργία του μπλοκ εκρόφησης που υποδέχεται τις προσροφητικές παγίδες Σχ. 5.3, αυτά που αφορούν το σύστημα κρυοπαγίδευσης που συλλέγει τα VOCs πριν την είσοδο τους στην χρωματογραφική στήλη Σχ. 5.4 και τέλος τον τρόπο εισόδου στην χρωματογραφική στήλη του GC/MS των VOCs.

1^η Κατηγορία Πειραμάτων

Έλεγχος των

- α. Ρυθμός ανόδου θερμοκρασίας (°C/min)
- β. Μέγιστη θερμοκρασία εκρόφησης (°C)
- γ. Χρόνος εκρόφησης (t min)



Σχήμα 5.3: Μπλόκ εκρόφησης-υποδοχής δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα (TDU).

A. Βέλτιστη θερμοκρασία εκρόφησης (°C)

- Τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις πρότυπου διαλύματος Υδρογονανθράκων
- Διαβίβαση σε Προσροφητική παγίδα
- Εκρόφηση παγίδας, κρυοπαγίδευση, εισαγωγή στο GC
- Επανάληψη της διαδικασίας για τη ήδη εκροφημένη προσροφητική παγίδα

Αποτελέσματα

Σαν βέλτιστη θερμοκρασία εκρόφησης διατηρήθηκε αυτή των 200 °C όπως και στην αρχική έκδοση της μονάδας θερμικής εκρόφησης.

B. Ρυθμός ανόδου της θερμοκρασίας (°C/min)

- Τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις πρότυπου διαλύματος Υδρογονανθράκων
- Διαβίβαση σε προσροφητική παγίδα
- Εκρόφηση παγίδας, κρυοπαγίδευση, εισαγωγή στο GC
- Εφαρμογή διαφορετικών ρυθμών ανόδου της θερμοκρασίας 40-10 °C/min.

Αποτελέσματα

Διαπιστώθηκε ότι ο βέλτιστος ρυθμός αύξησης θερμοκρασίας είναι οι 20 °C/min.

Με τον ρυθμό αυτό, δεν εμφανίζονται προβλήματα απότομης εκρόφησης των ουσιών που πολλές φορές οδηγούσαν στο φράξιμο της κρυοπαγίδας.

Επιπλέον η καταπόνηση του προσροφητικού υλικού που περιέχεται στις φύσιγγες είναι μικρότερη.

Γ. Χρόνος εκρόφησης (t min)

- Τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις πρότυπου διαλύματος Υδρογονανθράκων
- Διαβίβαση σε προσροφητική παγίδα
- Εκρόφηση παγίδας, κρυοπαγίδευση, εισαγωγή στο GC
- Διαφορετικοί χρόνοι εκρόφησης
- Επανάληψη της διαδικασίας για την ήδη εκροφημένη προσροφητική παγίδα

Αποτελέσματα

Διαπιστώθηκε ότι ο χρόνος εκρόφησης είναι δυνατόν να μειωθεί από τα 30 λεπτά εκρόφησης στα 20 λεπτά χωρίς να υπάρξει διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από τα χρωματογραφήματα.

Μικρότεροι χρόνοι έχουν σαν αποτέλεσμα την ελλιπή εκρόφηση των συστατικών.



Σχήμα 5.4: Σύστημα κρυοπαγίδευσης VOCs με υγρό άζωτο μονάδας TDU

2^η Κατηγορία Πειραμάτων

Έλεγχος των:

- α. Βέλτιστη θερμοκρασία ψύξης (°C).
- β. Ρυθμός ψύξης (°C/min)
- γ. Βέλτιστη θερμοκρασία θέρμανσης (°C)
- δ. Βέλτιστος ρυθμός θέρμανσης (°C/min)

A. Βέλτιστη θερμοκρασία ψύξης (°C)

- Τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις πρότυπου διαλύματος Υδρογονανθράκων
- Διαβίβαση σε προσροφητική παγίδα
- Εφαρμογή διαφορετικών θερμοκρασιών ψύξης
- Σύγκριση με πειράματα εισαγωγής των ίδιων συγκεντρώσεων απευθείας με ένεση στο GC/MS

Αποτελέσματα

Διαπιστώθηκε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία ψύξης σε συνδυασμό με την θερμοκρασία λειτουργίας της στήλης που χρησιμοποιείται σαν κρυοπαγίδα είναι αυτή των -120°C .

Για υψηλότερες θερμοκρασίες παρατηρήθηκαν απώλειες των ουσιών (μικρότερα εμβαδά ουσιών).

Για χαμηλότερες θερμοκρασίες οι ουσίες με υψηλά σημεία ζέσεως παρουσίαζαν μη αναπαραγωγίσιμη συμπεριφορά, όσον αφορά το εμβαδόν τους στα χρωματογραφήματα.

B. Ρυθμός ψύξης κρυοπαγίδας (°C/min)

- Τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις πρότυπου διαλύματος Υδρογονανθράκων
- Διαβίβαση σε προσροφητικές παγίδες
- Εφαρμογή διαφορετικών ρυθμών ψύξης
- Σύγκριση με πειράματα εισαγωγής των ίδιων συγκεντρώσεων απευθείας με ένεση στο GC/MS.

Αποτελέσματα

Διαπιστώθηκε ότι ο ρυθμός ψύξης της κρυοπαγίδας μεταφρασμένος σε χρόνο που απαιτείται για την μείωση της θερμοκρασίας στους -120°C πρέπει να κυμαίνεται από 2-3 λεπτά.

Γρήγορη ψύξη της κρυοπαγίδας $< 2-3\text{min}$, είχε σαν αποτέλεσμα την παγίδευση των ουσιών στο επάνω τμήμα της κρυοπαγίδας και την ελλιπή απομάκρυνση αυτών από την κρυοπαγίδα.

Αργή ψύξη της κρυοπαγίδας $>2-3\text{min}$ είχε σαν αποτέλεσμα απώλειες ουσιών που εκροφόνται πιο γρήγορα από τις προσροφητικές παγίδες.

Γ. Βέλτιστη/Μέγιστη θερμοκρασία θέρμανσης (°C)

- Τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις πρότυπου διαλύματος Υδρογονανθράκων
- Διαβίβαση σε προσροφητικές παγίδες
- Εφαρμογή διαφορετικών θερμοκρασιών θέρμανσης
- Σύγκριση με πειράματα εισαγωγής των ίδιων συγκεντρώσεων απευθείας με ένεση στο GC/MS.

Αποτελέσματα

Διαπιστώθηκε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία θέρμανσης της κρυοπαγίδας είναι αυτή των 220°C.

Σε υψηλότερες θερμοκρασίες η κρυοπαγίδα δεν συμπεριφερόταν με αναπαραγωγίσιμο τρόπο, πιθανώς λόγω φθοράς της.

Δ. Βέλτιστος ρυθμός θέρμανσης της κρυοπαγίδας (°C/min)

- Τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις πρότυπου διαλύματος Υδρογονανθράκων
- Διαβίβαση σε προσροφητικές παγίδες
- Σύγκριση με πειράματα εισαγωγής των ίδιων συγκεντρώσεων απευθείας με ένεση στο GC/MS

Αποτελέσματα

Διαπιστώθηκε ότι βέλτιστος ρυθμός ανόδου της θερμοκρασίας θέρμανσης της κρυοπαγίδας είναι οι 20°C/sec.

Η τελική θερμοκρασία θέρμανσης προέκυψε ότι πρέπει να διατηρείται στην τιμή αυτή καθ' όλη την διάρκεια της μεταφοράς του δείγματος από την κρυοπαγίδα στην χρωματογραφική στήλη.

Τα πειράματα της τρίτης κατηγορίας αναφέρονται στην επόμενη ενότητα, διότι συνδυάστηκαν με πειράματα που είχαν σαν στόχο τον προσδιορισμό χαρακτηριστικών της μεθόδου ανάλυσης της μονάδας θερμικής εκρόφησης.

5.2.2 Αξιολόγηση Χαρακτηριστικών Μεθόδου Λειτουργίας Μονάδας Θερμικής Εκρόφησης (TDU) για την Ανάλυση Εκπνεόμενου Αέρα (Method Validation)

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται οι πειραματικοί κύκλοι που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της συνολικής αξιολόγησης λειτουργίας του συστήματος TDU/GC/MS. Οι συγκεκριμένοι πειραματικοί κύκλοι είχαν σαν στόχο τον προσδιορισμό συγκεκριμένων χαρακτηριστικών (ευαισθησία, γραμμικότητα, επαναληψιμότητα, ελάχιστο όριο ανίχνευσης και ποσοστό ανάκτησης) της μεθόδου λειτουργίας της μονάδας θερμικής εκρόφησης για την ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα (Method Validation). Ουσιαστικά με το Method Validation καθιερώνεται μέσα από πειραματικές διαδικασίες ότι η μέθοδος ταιριάζει για τον σκοπό που χρησιμοποιείται δηλ. τα χαρακτηριστικά απόδοσης της είναι ικανά για την παραγωγή αποτελεσμάτων ανάλογα με τις ανάγκες του αναλυτικού προβλήματος.

Όλα τα πειράματα περιλάμβαναν

- Τη χρήση προσροφητικής παγίδας
- Την εφαρμογή κύκλου θερμικής εκρόφησης και
- Την εφαρμογή κρυοπαγίδευσης.

Στόχος ήταν η εξέταση των εξής παραμέτρων:

- Γραμμικότητα (linearity)
- Ευαισθησία

- Ελάχιστο όριο ανίχνευσης, (limit of detection, L.O.D)
- Επαναληψιμότητα (repeatability) και
- Ποσοστό ανάκτησης των ουσιών από την προσροφητική φύσιγγα, (recovery).

Οι παράμετροι της γραμμικότητας, της ευαισθησίας και του ελάχιστου ορίου ανίχνευσης είναι μεγέθη που επάγονται από την καμπύλη αναφοράς για την κάθε ουσία που αναλύεται με το σύστημα του TDU/GC/MS.

Πιο συγκεκριμένα η γραμμικότητα, που αφορά τον αν η σχέση της συγκέντρωσης μιας ουσίας με το τελικό σήμα του ανιχνευτή είναι γραμμική, εκφράζεται από τον συντελεστή R^2 της καμπύλης αναφοράς.

Η ευαισθησία, που εκφράζει την σχέση της μεταβολής του τελικού σήματος προς τη μεταβολή της συγκέντρωσης της προς προσδιορισμό ουσίας, δηλώνεται από την κλίση της καμπύλης αναφοράς για την κάθε ουσία.

Ενώ το ελάχιστο όριο ανίχνευσης είναι η μικρότερη ποσότητα που μπορεί να προσδιοριστεί από την μέθοδο μας και δίνεται από την σχέση $\alpha+3S_\alpha$ όπου σαν S_α μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τυπική απόκλιση του τυφλού ή του αραιότερου πρότυπου διαλύματος. (σημ. η σχέση τελικού σήματος προς τη συγκέντρωση για μια αναλυτική μέθοδος ορίζεται ως $P=\alpha+\beta C$).

Η επαναληψιμότητα, δίνεται από τον συντελεστή διακύμανση RSD και υπολογίζεται με αυτόν τον τρόπο η διακύμανση που έχει μια τιμή για το ίδιο δείγμα.

Για τις περισσότερες αναλυτικές διαδικασίες στις οποίες περιλαμβάνονται διαφορετικά στάδια το σημαντικότερο πρόβλημα είναι αυτό της καλής γνώσης του ποσού της αναλυόμενης ουσίας στο αρχικό δείγμα σε σχέση με το ποσό που εμφανίζεται στο τέλος της αναλυτικής διαδικασίας. Η ανάκτηση όπως αναφέρεται, περιλαμβάνει ουσιαστικά τα συστηματικά λάθη που εμφανίζονται στο αναλυτικό σύστημα.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι συντελεστές που υπολογίζονται για την κάθε παράμετρο που αξιολογεί την αναλυτική μέθοδο.

Πίνακας 5.2: Μεγέθη αξιολόγησης λειτουργίας TDU/GC/MS-συντελεστές που προσδιορίζονται

	ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ				
Μεγέθη	Γραμμικότητα	Ευαισθησία	Όριο Ανίχνευσης	Επαναληψιμότητα	Ανάκτηση
Συντελεστές	R^2	β (κλίση)	$\alpha+3S_\alpha$	RSD	$\%C_{\text{τελ}}/C_{\text{αρχ}}$

Οι δύο πειραματικοί κύκλοι που πραγματοποιήθηκαν περιλάμβαναν πειράματα τόσο με το TDU/GC/MS όσο και με το GC/MS.

Στο παρακάτω διάγραμμα συνοψίζονται οι σημαντικότερες συνθήκες που εφαρμόστηκαν για τον κάθε πειραματικό κύκλο.

Πειραματικοί Κύκλοι**1^{ος} Πειραματικός Κύκλος**

1. Χωρίς pulse εισαγωγή δείγματος στην χρωματογραφική στήλη.
2. Dry Purge <u>12 min</u>
3. Μέθοδος TDU Θερμ. Θερμικής Εκρόφησης: 200°C Χρόνος Θερμ. Εκρόφησης: 30 λεπτά Ροή φέροντος αερίου: 30ml/min Θερμ. Ψύξης Κρυοπαγίδας: -120 °C Θερμ. Θέρμανσης Κρυοπαγίδας: 220 °C.

2^{ος} Πειραματικός Κύκλος

1. Με pulse εισαγωγή δείγματος στην χρωματογραφική στήλη.
2. Καθόλου Dry Purge
3. Μέθοδος TDU Θερμ. Θερμικής Εκρόφησης: 200°C Χρόνος Θερμ. Εκρόφησης: 20 λεπτά Ροή φέροντος αερίου: 30ml/min Θερμ. Ψύξης Κρυοπαγίδας: -120 °C Θερμ. Θέρμανσης Κρυοπαγίδας: 220 °C.

Ο 1^{ος} Κύκλος Πειραμάτων περιλάμβανε 16 πειράματα χωρισμένα σε 4 πειράματα ημερησίως, εκ των οποίων αυτά που πραγματοποιήθηκαν την 2^η, 3^η και 4^η μέρα αποτελούσαν επαναλήψεις των πειραμάτων της 1^{ης} μέρας όπως εμφανίζονται πιο κάτω.

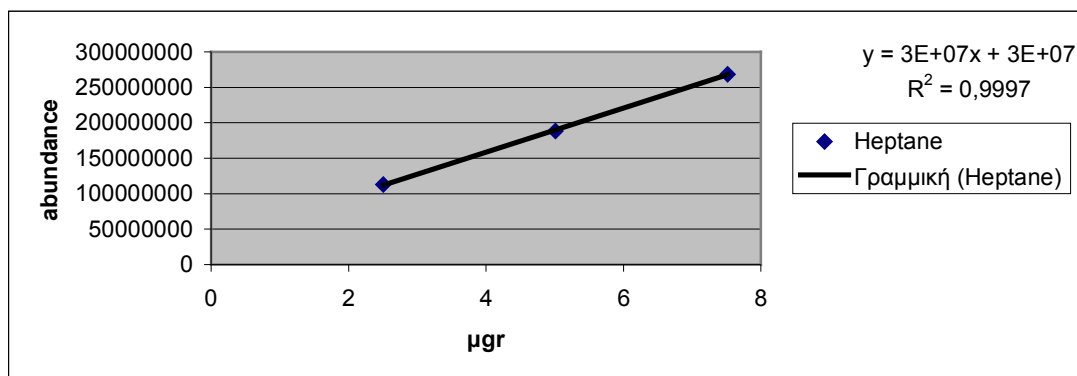
Πίνακας 5.3: Τρόπος εκτέλεσης πειραμάτων πρώτου πειραματικού κύκλου

	1 ^η Μέρα	2 ^η Μέρα	3 ^η Μέρα	4 ^η Μέρα
1.	0,5 μL Πρότ. Δ/μα (TDU)			
2.	1,0 μL Πρότ. Δ/μα (TDU)			
3.	1,5 μL Πρότ. Δ/μα (TDU)	ΟΜΟΙΩΣ	ΟΜΟΙΩΣ	ΟΜΟΙΩΣ
4.	1,0 μL Πρότ. Δ/μα (GC)			

Για τις ενώσεις

- pentane 2 methyl,
- hexane
- heptane
- hexane 2,5 dimethyl
- octane
- nonane

δημιουργήθηκαν καμπύλες αναφοράς, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά για το επτάνιο στο Σχ. 5.5



Σχήμα 5.5: Καμπύλη αναφοράς επτανίου για τα πειράματα του 1^{ου} πειραματικού κύκλου.

Από τις καμπύλες αναφοράς για τις παραπάνω ενώσεις προέκυψαν τα εξής:

Πίνακας 5.4: Αποτελέσματα μετρήσεων 1^{ου} πειραματικού κύκλου για γραμμικότητα, ευαισθησία και ελάχιστο όριο ανίχνευσης

	Pentane 2 Methyl	Hexane	Heptane	Hexane 2,5 dimethyl	Octane	Nonane
Γραμμικότητα (R ²)	0,990	0,978	0,999	0,999	0,993	0,970
Ευαισθησία (κλίση) (abd/μgr)	5x10 ⁷	5x10 ⁷	3x10 ⁷	3x10 ⁷	2x10 ⁷	2x10 ⁷
Όριο Ανίχνευσης (μgr)	3,158	2,578	3,930	4,680	4,430	3,294

Επιπλέον η επαναληψιμότητα για τις πιο πάνω ουσίες εκφρασμένη σε RSD (για κάθε μια από τις 3 ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν) και το ποσοστό ανάκτησης τους (σύγκριση με τα αποτελέσματα του ίδιου δείγματος σε GC) παρουσιάζεται στον πίνακα 5.5

Πίνακας 5.5: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας και ποσοστού ανάκτησης 1^{ου} πειραματικού κύκλου

	Pentane 2 Methyl	Hexane	Heptane	Hexane 2,5 dimethyl	Octane	Nonane
RSD% (0,5 μL)	49,14	48,65	30,53	27,01	23,12	20,21
RSD% (1 μL)	11,64	10,99	18,02	13,47	8,81	3,41
RSD% (1,5 μL)	17,17	11,17	5,28	2,35	2,86	3,04
RSD% (1 μL GC)	1,69	1,78	1,76	2,34	0,73	1,86
Ποσοστό Ανάκτησης (%)	-	-	86	76	54	36

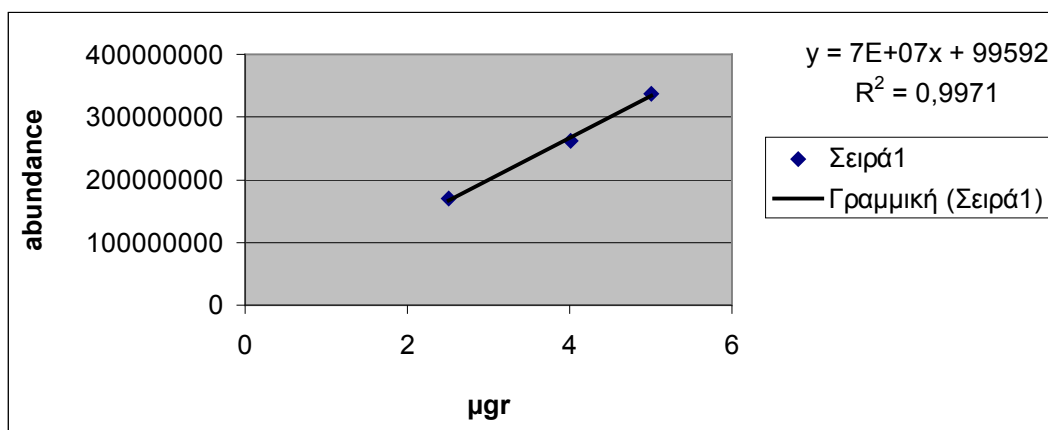
Ο 2^{ος} Κύκλος Πειραμάτων περιλάμβανε επίσης 16 πειράματα χωρισμένα σε 4 ομάδες παρόμοια με τον 1^ο Πειραματικό Κύκλο.

Για τις ενώσεις

- pentane
- pentane 2-methyl
- hexane
- heptane
- hexane 2,5 dimethyl
- octane
- nonane

κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς για 3 διαφορετικές ποσότητες των πιο πάνω ουσιών.

Χαρακτηριστικά παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς για το επτάνιο.



Σχήμα 5.6: Καμπύλη αναφοράς επτανίου πειραμάτων 2^{ου} πειραματικού κύκλου.

Από τις καμπύλες αναφοράς για τις παραπάνω ενώσεις προέκυψαν τα εξής:

Πίνακας 5.6: Αποτελέσματα μετρήσεων 2^{ου} πειραματικού κύκλου για γραμμικότητα, ευαισθησία και ελάχιστο όριο ανίχνευσης

	Pentane	Pentane 2 Methyl	Hexane	Heptane	Hexane 2,5 dimethyl	Octane	Nonane
Γραμμικότητα (R ²)	0,899	0,999	0,899	0,997	1,000	0,996	0,983
Ευαισθησία (κλίση)	2x10 ⁷	3x10 ⁷	6x10 ⁷	7x10 ⁷	8x10 ⁷	9x10 ⁷	1x10 ⁸
Όριο Ανίχνευσης (μgr)	3,166	0,915	2,660	0,106	0,090	0,620	0,507

Επιπλέον η επαναληψιμότητα και το ποσοστό ανάκτησης εμφανίζεται στον πίνακα 5.7:

Πίνακας 5.7: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας και ποσοστού ανάκτησης 2^{ου} πειραματικού κύκλου (TDU/GC/MS- GC/MS)

	Butane 2 methyl	Pentane	Pentane 2 Methyl	Hexane	Hexane 2 methyl	Heptane	Hexane 2,5 dimethyl	Octane	Nonane	Chlorobenzene d-5
RSD% (0,5 µL)	173,20	69,85	13,70	10,94	9,82	5,67	3,37	3,22	3,24	1,67
RSD% (0,8 µL)	85,30	18,20	7,94	5,65	2,47	2,16	0,49	3,04	3,22	0,49
RSD% (1 µL)	66,22	8,12	2,72	4,96	1,38	0,81	0,40	1,31	1,47	0,95
RSD% (1 µL GC)	10,62	9,97	6,69	6,57	2,25	3,85	3,15	1,78	2,35	2,07
Ποσοστό Ανάκτησης (%)	22	69	75	78	82	88	85	95	95	98

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ενότητας αυτής και αφορούν τα χαρακτηριστικά της μεθόδου συνοψίζονται παρακάτω:

Επιλέγεται η δεύτερη μεθοδολογία λειτουργίας της μονάδας θερμικής εκρόφησης/ αέριας χρωματογραφίας/ φασματομετρίας μάζας. Αυτή της pulse εισαγωγής δείγματος στην χρωματογραφική στήλη. Τα υπόλοιπα συμπεράσματα που ακολουθούν αφορούν την δεύτερη μεθοδολογία.

- ❖ Διαπιστώθηκε ότι εμφανίζεται γραμμικότητα για το εύρος των ποσοτήτων των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν, η οποία κυμαίνεται από 0,899 (για το πεντάνιο) μέχρι 1,000 (για το 2,5 διμέθυλο εξάνιο).
- ❖ Για την ευαισθησία της μεθόδου αυτή κυμάνθηκε στην ίδια τάξη μεγέθους για το σύνολο των ουσιών που υπολογίστηκε ($2 \cdot 10^7$ - $10 \cdot 10^7$ abd/μgr). Επιπλέον η ευαισθησία εμφανίζει αύξηση καθώς το μοριακό βάρος του υδρογονάνθρακα αυξάνει. Έτσι η μεγαλύτερη τιμή για την ευαισθησία υπολογίζεται για το εννιάνιο στα $10 \cdot 10^7$ abd/μgr (δηλαδή για μεταβολή της ποσότητας της ουσίας κατά 1 μgr παρατηρείται μεταβολή του σήματος της τάξης του $10 \cdot 10^7$).
- ❖ Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης της μεθόδου για τις ουσίες που εξετάστηκαν κυμάνθηκε μεταξύ 0,090-3,166 μgr (2,5 διμέθυλο εξάνιο-πεντάνιο).
- ❖ Η επαναληψιμότητα της μεθόδου εκφρασμένη σε %RSD κυμάνθηκε από 173,20%-1,67% για προσθήκη 0,5μL στην προσροφητική παγίδα. Από 85,30%-0,49% για προσθήκη 0,8μL στην προσροφητική παγίδα, και από 66,22%-0,40% για προσθήκη 1μL στην προσροφητική παγίδα, ενώ για την ανάλυση 1μL του προτύπου διαλύματος με GC το ποσοστό αυτό κυμάνθηκε από 10,62%-1,78%. Γίνεται φανερό πως μεγαλύτερη επαναληψιμότητα εμφανίζουν οι ουσίες με μεγαλύτερα μοριακά βάρη και μικρότερη πτητικότητα. Επιπλέον καλύτερη επαναληψιμότητα εμφανίζεται στα πειράματα με μεγαλύτερες ποσότητες ουσιών. Με βάση την παραδοχή ότι διακυμάνσεις τιμών από 50-100% θα χαρακτηρίζονται “στατιστικά μη σημαντικές” από 100-300% “στατιστικά σημαντικές” και >300% “αυξημένες ή μειωμένες” δηλαδή υπάρχει σημαντική αύξηση ή ελάττωση των τιμών που προκύπτουν. Οι τιμές του πίνακα 5.7 που αφορούν τα %RSD χαρακτηρίζονται σαν “στατιστικά μη σημαντικά” εκτός από μια τιμή που αφορά το 2-μέθυλο βουτάνιο και ανήκει στην περιοχή του “στατιστικά σημαντικού”.
- ❖ Το ποσοστό ανάκτησης των ουσιών που εξετάστηκαν κυμάνθηκε από 22-98%. Με τιμή median 88%. Τα μεγαλύτερα ποσοστά ανάκτησης προέκυψαν για μεγαλύτερου μοριακού βάρους και χαμηλότερης πτητικότητας ενώσεις.

Σημείωση: η επιλογή της περιοχής των ποσοτήτων που χρησιμοποιήθηκαν για τους πειραματικούς κύκλους με τις ποσότητες που εμφανίζονται στον εκπνεόμενο αέρα είναι εν πολλύς συγκρίσιμα. Δηλαδή 1,754-9,619 μgr για τα πρότυπα διαλύματα και 1,162-9,285 μgr για τον εκπνεόμενο αέρα.

5.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΩΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΓΙΑ ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ VOCs ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ.

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των VOCs για την αρχική σειρά μετρήσεων που αναφέρεται στους εθελοντές της ομάδας αναφοράς προήλθε με την εφαρμογή της μεθόδου του “εσωτερικού προτύπου”. Η μέθοδος αυτή εμφανίζεται στην μέθοδο TO-15 της EPA, και αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό των VOCs που εμφανίζονται στον περιβαλλοντικό αέρα [EPA 1997].

Η εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της κάθε ουσίας είναι η παρακάτω:

$$C_i = \frac{A_i}{A_{ISTD}} \times \frac{1}{RRF_i} \times C_{ISTD} \quad [5.1]$$

στην σχέση αυτή, που αναλύεται σε επόμενη ενότητα η τιμή RRF που αντιπροσωπεύει τον συντελεστή απόκρισης της ουσίας *i* σε σχέση με το εσωτερικό πρότυπο και εκφράζει τον διαφορετικό ιονισμό της ουσίας *i*, σε σύγκριση με τον ιονισμό του εσωτερικού προτύπου, προήλθε από πειραματικές μετρήσεις που παρουσιάζονται πιο κάτω.

5.3.1 Προσδιορισμός Συντελεστών Απόκρισης (RRF)

Για τον προσδιορισμό των συντελεστών απόκρισης των ουσιών που ανιχνεύονται στον εκπνεόμενο αέρα πραγματοποιήθηκε σειρά πειραμάτων με τα χαρακτηριστικά που εμφανίζονται πιο κάτω:

Υλικά:

- 4 πρότυπα διαλύματα ενώσεων (C=50 mmol/l)
- 12 προσροφητικές παγίδες (3 παγίδες για κάθε πρότυπο διάλυμα)
- σύσταση πρότυπων διαλυμάτων
 - 1^ο (2-methylbutane, n-pentane, 2-methylpentane, n-hexane, 2-methylhexane, n-octane, n-nonane, cyclohexane, chlorobenzene, Chlorobenzene-d5)
 - 2^ο (acetaldehyde, ethanol, acetone, 2-propanol, 2-methyl-2-propanol, 2-methyl propanal, acetic acid, propanoic Acid, cyclopentanone, cyclohexanol, benzaldehyde, phenol, Chlorobenzene-d5)
 - 3^ο (benzene, toluene, ethylbenzene, p-xylene, o-xylene, propylbenzene, 1-ethyl-2-methylbenzene, 1,2,4-trimethylbenzene, naphthalene, 1-methylnaphthalene, Chlorobenzene-d5)
 - 4^ο (acetonitrile, formamide, N-methylformamide, acetamide, dichloromethane, 1-chlorobutane, chloroform, 1,1,1-trichloroethane, 1,1,2-trichloro-1,2,2-trifluoroethane, chlorobenzene, Chlorobenzene-d5)

Περιγραφή

Προσθήκη ποσότητας 1 μL πρότυπου διαλύματος στην προσροφητική παγίδα.

Εφαρμογή κύκλου θερμικής εκρόφησης, κρουοπαγίδευσης και εισαγωγής στον αέριο χρωματογράφο.

Από την σχέση [5.2] για κάθε πείραμα υπολογίστηκε ο σχετικός συντελεστής απόκρισης κάθε ουσίας του πρότυπου διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε.

$$RRF_i = \frac{A_i}{A_{ISTD}} \times \frac{1}{C_i} \times C_{ISTD} \quad [5.2]$$

όπου:

- A_i** το εμβαδόν της ουσίας για την οποία προσδιορίζεται ο συντελεστής απόκρισης που προκύπτει από το χρωματογράφημα του εκάστοτε πρότυπου διαλύματος.
- A_{ISTD}** το εμβαδόν αντίστοιχα του εσωτερικού προτύπου.
- C_i** η συγκέντρωση της ουσίας για την οποία προσδιορίζεται ο συντελεστής απόκρισης.
- C_{ISTD}** η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου.

Από την σχέση (5.2) υπολογίζονται οι συντελεστές απόκρισης για την κάθε ουσία του πρότυπου διαλύματος, σε σχέση με το εσωτερικό πρότυπο τρεις φορές για κάθε ουσία. Ενώ από την σχέση [5.3] υπολογίζεται ο μέσος συντελεστής απόκρισης που προέρχεται από τις τρεις μετρήσεις και σημειώνεται πλέον σαν ο συντελεστής απόκρισης της κάθε ουσίας που εφαρμόζεται στην εξίσωση [5.1] για τον ποσοτικό υπολογισμό της συγκέντρωσης της ουσίας σε άγνωστο δείγμα.

$$\overline{RRF}_i = \frac{RRF_i}{n} \quad [5.3]$$

όπου:

- RRF_i** ο συντελεστής απόκρισης της ουσίας που προσδιορίζεται κάθε φορά από τα πρότυπα διαλύματα.
- n** ο αριθμός των φορών που έχει υπολογιστεί ο συντελεστής απόκρισης για κάθε ουσία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Α΄ ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

6.1 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της πρώτης σειράς μετρήσεων υπήρξε ο προσδιορισμός των πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs) που εμφανίζονται στον εκπνεόμενο αέρα, το αίμα και τα ούρα φυσιολογικών εθελοντών και στόχο τα αποτελέσματα αυτά να λειτουργήσουν σαν τις τιμές αναφοράς για τις υπόλοιπες ομάδες εθελοντών που μελετήθηκαν [Statheropoulos M. et al. 2005].

6.2 ΟΜΑΔΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Σε 15 υγιείς εθελοντές, 10 άρρενες (μέση ηλικία 33) και 5 θήλυ (μέση ηλικία 28) έγινε δειγματοληψία ανθρώπινων βιολογικών εκκρίσεων:

- Αίματος
- Ούρων
- και Εκπνεόμενου Αέρα.

Αρχικά οι 15 εθελοντές έδωσαν ατομική συνέντευξη στους ιατρούς που συμμετείχαν στην έρευνα και οι πληροφορίες αυτές καταγράφηκαν σε ηλεκτρονικό αρχείο με σύστημα κωδικοποίησης (λόγω ιατρικού απορρήτου) προκειμένου να αξιοποιηθούν αργότερα στα πλαίσια της έρευνας. Το σχετικό αρχείο των εθελοντών περιλάμβανε στοιχεία όπως: ατομικά στοιχεία εθελοντή, πιθανές αρχικές διαγνώσεις, κύρια ενοχλήματα, στοιχεία παραπομπής, ατομικό αναμνηστικό, οικογενειακό αναμνηστικό, παρούσα νόσος, κλινική εξέταση, παρακλινικές εξετάσεις, φαρμακευτική και διατροφική αγωγή, τελική διάγνωση.

Δεδομένου ότι στην βιβλιογραφία παρουσιάζονται διαφορετικές τιμές στην παραγωγή συγκεκριμένων ουσιών που σχετίζονται με ψυχολογικές διαταραχές, το ψυχολογικό προφίλ των εθελοντών ελέγχθηκε επίσης. Στους εθελοντές πραγματοποιήθηκαν ψυχομετρικά τεστ που περιλάμβαναν τα εξής: Jung, Sifneos, Holme-Rahe, το Mini Mental Examination, και του Spilberg.

Στη συνέχεια προκειμένου να επιτευχθεί σωστά και αξιόπιστα η δειγματοληψία, οι εθελοντές ακολούθησαν ένα κοινό για όλους «*Ιατρικό πρωτόκολλο δειγματοληψίας*» (βλ. Παράρτημα).

Αντίστοιχα η δειγματοληψία έγινε με βάση:

- το σχετικό «*Πρωτόκολλο ηθικής και δεοντολογίας για ιατρικά πειράματα-Διακήρυξη της Χαβάης*» (βλ. Παράρτημα).
- την σχετική «*Συμφωνία για εθελοντική συμμετοχή*»

6.3 ΥΛΙΚΑ-ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ-ΜΕΘΟΔΟΣ

6.3.1 Υλικά Συλλογής Δειγμάτων Εκπνεόμενου Αέρα

Για τις αναλύσεις των δειγμάτων του εκπνεόμενου αέρα χρησιμοποιήθηκαν:

- Σακούλες δειγματοληψίας αερίων Tedlar (size 12×12'', vol. 5L, Alltech Assoc. USA).

- Προσροφητικές παγίδες (διαστάσεων 6 mm od, 4 mm id και 115 mm μήκος), τύπου TD-300, τριών προσροφητικών στρωμάτων (300 mgr, mesh size 60/80 Carbograph 2, + 200 mgr, mesh size 20/40 Carbograph 1+ 125 mgr, mesh size 20/40 Carboshieve S-III), (Alltech Assoc. USA).
- Αντλία Buck-Genie, μοντέλο VSS-1, ροής 5-600 cc/min, της A. P. Buck Inc.
- Αέριο He για την αναγέννηση των προσροφητικών παγίδων
- Ειδικά παρεμβύσματα για την αποθήκευση των VOCs στις προσροφητικές παγίδες (1/4 " nut brass, 1/4 " cap brass και 1/4 " teflon ferrules, Alltech Assoc. USA).
- Πρότυπο μεθανολικό διάλυμα Chlorobenzene d-5 (συγκέντρωση 50 mmol/L) (IT-Chem Hellas) σαν εσωτερικό πρότυπο.

6.3.2 Υλικά Συλλογής Δειγμάτων Αίματος και Ούρων

Για την συλλογή των δειγμάτων αίματος και ούρων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- Ειδικά χρωματογραφικά φιαλίδια (14-16 ml vials με πώματα, Alltech Assoc. USA).
- Ειδικό πώμα για τα φιαλίδια (open top screw cap type 18/400), όπου μπορεί να τοποθετηθεί ειδικό septum (TFE/ silicon liners type 18/400, 10/50 mil, Alltech Assoc. USA).
- Ειδικές ίνες προσρόφησης SPME (85 μm Carboxen/ polydimethylsilicone σε υπόστρωμα Stableflex, Supelco).
- Φορέας προσροφητικών ινών SPME (SPME fiber holder for manual sampling, Supelco).

6.3.3 Οργανολογία Ανάλυσης Δειγμάτων Εκπνεόμενου Αέρα

Η ανάλυση των δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα πραγματοποιήθηκε με σύστημα Θερμικής Εκρόφησης συζευγμένο με Αέριο Χρωματογράφο και Φασματοόμετρο Μάζας (TDU/GC/MS) (TDU, τμήμα Χημικών Μηχανικών, Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας, ΕΜΠ), (GC/MS, HP 5890/5972, Agilent Technologies).

Κατά την εκρόφηση η ροή He ήταν ρυθμισμένη στα 30 ml/min ενώ η θερμοκρασία της εκρόφησης ήταν σταθερή στους 200 °C. Για την ψυχρή επανεστίαση των πτητικών οργανικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η τριχοειδής στήλη AT-Q (0.53 mm id, 22 cm μήκος, με 9 μm film thickness of porous divinylbenzene polymer, Alltech Assoc. USA). Η διαδικασία της εκρόφησης και επανεστίασης διήρκεσε 20 λεπτά. Μετά το πέρας των 20 λεπτών, ακολούθησε ταχύτατη θέρμανση της κρυοπαγίδας (20 sec) για την ακαριαία είσοδο των παγιδευμένων πτητικών ενώσεων στην χρωματογραφική στήλη του GC.

Η πίεση στην κεφαλή της στήλης ρυθμίστηκε στα 25 psi Η χρωματογραφική στήλη διαχωρισμού που χρησιμοποιήθηκε είναι η SPB-624 (60m, 0.25 mm ID, 1.4 μm film thickness, Supelco). Ενώ ο θερμοπρογραμματισμός του φούρνου του GC ήταν ως ακολούθως: 35 °C για 5 min, αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι τους 180 °C με ρυθμό ανόδου τους 4 °C/min και παραμονή για 20 min. Το εύρος μαζών που εξετάστηκαν από το MSD ήταν μεταξύ 42-350 amu, με τιμή σκαναρίσματος τα 1,8 scan/sec.

6.3.4 Οργανολογία Ανάλυσης Δειγμάτων Αίματος & Ούρων

Τα δείγματα του αίματος και των ούρων αναλύθηκαν με σύστημα Αέριου Χρωματογράφου συζευγμένου με Φασματομέτρο Μάζας (HP 5890/5972, Agilent Technologies). Για την ομαλή εισαγωγή των πτητικών ουσιών στη χρωματογραφική στήλη, τοποθετήθηκε στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου ειδικό inlet liner από την Supelco.

Η ροή φέροντος αερίου (He) στην χρωματογραφική στήλη ρυθμίστηκε στα 30 ml/min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα του χρωματογραφικού συστήματος κι επομένως και της θερμοκρασίας εκρόφησης της ίνας SPME, διατηρήθηκε σταθερή στους 220 °C. Ο τρόπος λειτουργίας του συστήματος ήταν κατά την διάρκεια της εκρόφησης της ίνας SPME ήταν splitless και άλλαξε σε split μετά από 4 min. Οι ρυθμίσεις που αφορούν τον θερμοπρογραμματισμό του GC και των παραμέτρων του MSD ήταν όμοιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αναλύσεις των δειγμάτων του εκπνεόμενου αέρα. Η μόνη διαφορά ήταν στην τιμή του δυναμικού του ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή του MSD, το οποίο ρυθμίστηκε σε τιμή 200 V υψηλότερα της τιμής που προέκυψε από το autotune, για την ενίσχυση της ανιχνευτικής ικανότητας του MSD.

6.3.5 Μέθοδος

Οι εθελοντές χωρίστηκαν σε 3 ομάδες των 5 ατόμων και οι δειγματοληψίες έγιναν την ίδια ημέρα για κάθε ομάδα. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων συνεργάστηκαν από κοινού το τμήμα Χημικών Μηχανικών (τομέας Ι) του Ε.Μ.Π, το Αιγινήτειο Νοσοκομείο και η Ιατροδικαστική Υπηρεσία στο Γουδί. Την όλη ευθύνη, το συντονισμό αλλά και το κυρίως βάρος της έρευνας ανέλαβε το Ε.Μ.Π.

Η δειγματοληψία αίματος και ούρων έγινε στο Αιγινήτειο Νοσοκομείο ενώ του εκπνεόμενου αέρα στο Ε.Μ.Π. Σημειώνεται ότι η δειγματοληψία έγινε υπό πλήρη ιατρική παρακολούθηση και από ιατρικό προσωπικό. Για την επιβεβαίωση των βιοχημικών αναλύσεων διπλά δείγματα αίματος και ούρων των εθελοντών απεστάλησαν στην Ιατροδικαστική Υπηρεσία στο Γουδί, ενώ το Αιγινήτειο Νοσοκομείο κράτησε διπλά δείγματα πλάσματος αίματος των εθελοντών προκειμένου να επιβεβαιώσει τα αποτελέσματα των βιοχημικών αναλύσεων.

Για το συντονισμό, τον έλεγχο, αλλά και για την τήρηση του ιατρικού απορρήτου τα δείγματα επισημάνθηκαν με δηνήφιο κωδικό αρίθμησης ενώ παράλληλα ετοιμάστηκαν ειδικά φύλλα παράδοσης-παραλαβής δειγμάτων για κάθε υπηρεσία.

Τα *δείγματα του εκπνεόμενου αέρα* λήφθηκαν με παγίδευση σε κατάλληλη προσροφητική παγίδα, μετά από συγκέντρωσή τους σε σακούλες Tedlar. Οι εθελοντές εκπνέουν ήρεμα, μέσα στην σακούλα δειγματοληψίας ενώ εισπνέουν από την μύτη. Οι σακούλες αυτές διαθέτουν βαλβίδα εισαγωγής αέρα/απομόνωσης, ώστε να μην υπάρχουν απώλειες κατά την αποθήκευσή τους. Η μεταφορά των δειγμάτων στις προσροφητικές παγίδες έγινε με την βοήθεια αντλίας, με ροή δειγματοληψίας τα 200 ml/min. Μετά την μεταφορά των ουσιών στις προσροφητικές παγίδες αυτές σφραγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε ψυγείο, στους 4°C, μέχρι την ημερομηνία επεξεργασίας τους. Σημειώνεται, ότι πριν από την δειγματοληψία, όλες οι προσροφητικές παγίδες αναγεννήθηκαν για 2h στους 300 °C με ροή He, 150 ml/min και εμβολιάστηκαν με 1 μL εσωτερικού πρότυπου (Chlorobenzene D-5). Τυφλά δείγματα από τον χώρο δειγματοληψίας των δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα λήφθηκαν με ανάλογο τρόπο. Επίσης η λειτουργία της αρχικής μονάδας θερμικής εκρόφησης

αξιολογήθηκε, το όριο ανίχνευσης για πρότυπη ουσία εξανίου βρέθηκε μικρότερη από 10 ngg, για λειτουργία του συστήματος σαν εισαγωγέας. Η γραμμικότητα του συστήματος εμφανίζει τιμή r^2 0,986 για καμπύλη αναφοράς από ngg μέχρι την περιοχή των μgg και τιμή 0,943 για μgg μέχρι την περιοχή των ελάχιστων μgg. Πειράματα αναπαραγωγιμότητας του συστήματος που πραγματοποιήθηκαν με την ένεση 2 ml διαλύματος 0,001% εξανίου σε τολουόλιο εμφάνισαν τιμές RSD = 5,24%.

Για **τα δείγματα του αίματος και των ούρων** που λήφθηκαν από τους εθελοντές πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω:

1. Βιοχημικές αναλύσεις (Γενική αίματος, ούρων, άλλες παράλληλες αναλύσεις, ορμονολογικές) από το Αιγινήτειο Νοσοκομείο.
2. Χημικές αναλύσεις πτητικών οργανικών συστατικών στην αέρια φάση, από το εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του τμήματος Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π.
3. Ανάλυση, επεξεργασία, ποιοτικός και ποσοτικός διαχωρισμός των χημικών ουσιών των εθελοντών, σχολιασμός και συνδυασμός των αποτελεσμάτων από το εργαστήριο ΑΑΧ του τμήματος Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π.

Στο μικροβιολογικό εργαστήριο του Αιγινήτειου Νοσοκομείου κάθε ένας από τους 15 εθελοντές έδωσε 20 ml αίματος και \approx 100 ml ούρων. Στη συνέχεια έγινε ο διαχωρισμός των δειγμάτων: από το Αιγινήτειο Νοσοκομείο κρατήθηκαν οι αναγκαίες ποσότητες για τις βιοχημικές και ορμονολογικές αναλύσεις ενώ διπλή ποσότητα δείγματος 5 ml από κάθε εθελοντή τοποθετήθηκε σε ειδικά φιαλίδια όγκου 15 ml, τα οποία και κρατήθηκαν κλειστά. Τα δείγματα (21 συνολικά/ημέρα = 2*10 ούρων, 2*10 ούρων αίματος, 1 τυφλό) από το μικροβιολογικό εργαστήριο του Αιγινήτειου Νοσοκομείου μεταφέρονταν καθημερινά στο αναλυτικό εργαστήριο του Τμήματος Χημικών Μηχανικών για απευθείας μέτρηση (11 δείγματα/ημέρα = 5 ούρων+5 αίματος, 1 τυφλό), με ενδιάμεση στάση στην Ιατροδικαστική Υπηρεσία, του Λαϊκού Νοσοκομείου (10 δείγματα/ημέρα = 5 ούρων+5 αίματος), για αποθήκευση των διπλών δειγμάτων σε βαθιά κατάψυξη (-80°C).

Αμέσως με την άφιξη των κωδικοποιημένων δειγμάτων στο αναλυτικό εργαστήριο του Ε.Μ.Π. (11 δείγματα/ημέρα = 5 ούρων+5 αίματος, 1 τυφλό), τα δείγματα εμβολιαζόνταν με εσωτερικό πρότυπο 0,5 μL Chlorobenzene D-5 και στη συνέχεια γινόταν πολύ γρήγορη αλλαγή του πόματος με το ειδικό septum. Μετά την διάτρηση του septum από τον φορέα της ίνας ακολουθούσε έκθεση της ίνας SPME στο δείγμα του αίματος και των ούρων. Ο χρόνος έκθεσης της ίνας στην υπερκείμενη φάση των δειγμάτων ήταν 30 min. Μετά την παγίδευση των ουσιών, η ίνα εισαγόταν στον θερμό εισαγωγέα του GC για ανάλυση. Τα υπόλοιπα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ψυγείο, λόγω της ευαισθησίας των δειγμάτων, μέχρι να έρθει η σειρά τους για ανάλυση. Ο χρόνος ανάλυσης μεταξύ του πρώτου και του τελευταίου δείγματος δεν ξεπερνούσε τις 20 h. Όλες οι ίνες προτού χρησιμοποιηθούν αναγεννήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή Σημειώνεται ότι και τις 3 ημέρες της δειγματοληψίας προκειμένου να διεκπεραιωθούν όλες οι αναλύσεις το εργαστήριο δούλεψε σε συνεχείς βάρδιες ολόκληρο το εικοσιτετράωρο.

Η αναγνώριση των χρωματογραφικών κορυφών που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων του εκπνεόμενου αέρα, του αίματος και των ούρων έγινε με την βοήθεια της βιβλιοθήκης φασμάτων μάζας Wiley 138 του οργάνου και για ποσοστά ομοιότητας πάνω από 70%. Στην συνέχεια ακολούθησε επιβεβαίωση των

αποτελεσμάτων με την βοήθεια του “Easy ID” (HP, Chemstation). Η χρήση του “Easy ID” εφαρμόστηκε για μεγαλύτερη αυτοματοποίηση των και ενίσχυση της αναγνώρισης των κορυφών των ουσιών. Τα στοιχεία αναζήτησης των ουσιών αφορούσαν τον χρόνο ανάσχεσης της ουσίας, το βασικό ιόν και τρία κύρια ιόντα αυτής.

Η μέθοδος ποσοτικοποίησης των δειγμάτων του εκπνεόμενου αέρα πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια της εξίσωσης 5.1.

$$C_i = \frac{A_i}{A_{ISTD}} \times \frac{1}{RRF_i} \times C_{ISTD} \quad [5.1]$$

όπου:

C_i η συγκέντρωση της ουσίας i στην αέρια φάση εκφρασμένη σε nmol/L εκπνεόμενου αέρα.

A_i το εμβαδόν της χρωματογραφικής κορυφής της ουσίας i σε αυθαίρετες μονάδες

A_{ISTD} το εμβαδόν της χρωματογραφικής κορυφής του εσωτερικού προτύπου, σε αυθαίρετες μονάδες

RRF_i ο συντελεστής απόκρισης της ουσίας i (αναλύεται στο κεφάλαιο 5)

C_{ISTD} η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου στον συνολικό όγκο εκπνεόμενου αέρα που συλλέγεται σε nmol/L. Η συγκέντρωση αυτή έχει υπολογιστεί στα 10 nmol/L.

6.4 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ο πραγματικά τεράστιος όγκος πρωτογενών δεδομένων από την μια πλευρά αλλά και η προσπάθεια συσχέτισης των πειραμάτων (αίμα, ούρα, εκπνεόμενος αέρας, βιοχημικές αναλύσεις) μεταξύ τους, μας οδήγησε στην αναζήτηση «έξυπνων γραφημάτων», τα οποία θα οδηγούσαν σε γρήγορες συσχετίσεις και θα έδιναν όλες τις κρυμμένες πληροφορίες που πιθανών να χάνονταν λόγω του τεράστιου όγκου δεδομένων.

Τα αποτελέσματα που ακολουθούν παρουσιάζονται με την μορφή των contour plots, μιας πρωτοποριακής και έξυπνης τεχνικής, η οποία απεικονίζει την κάτοψη ισοϋψών καμπυλών ενός τρισδιάστατου διαγράμματος. Στα contour απεικονίζονται οι % εκατοστιαίες αποκλίσεις από τις μέσες τιμές συγκεντρώσεων ή των ουσιών:

$$[(C_{\text{ουσία}} - C) / C] \times 100$$

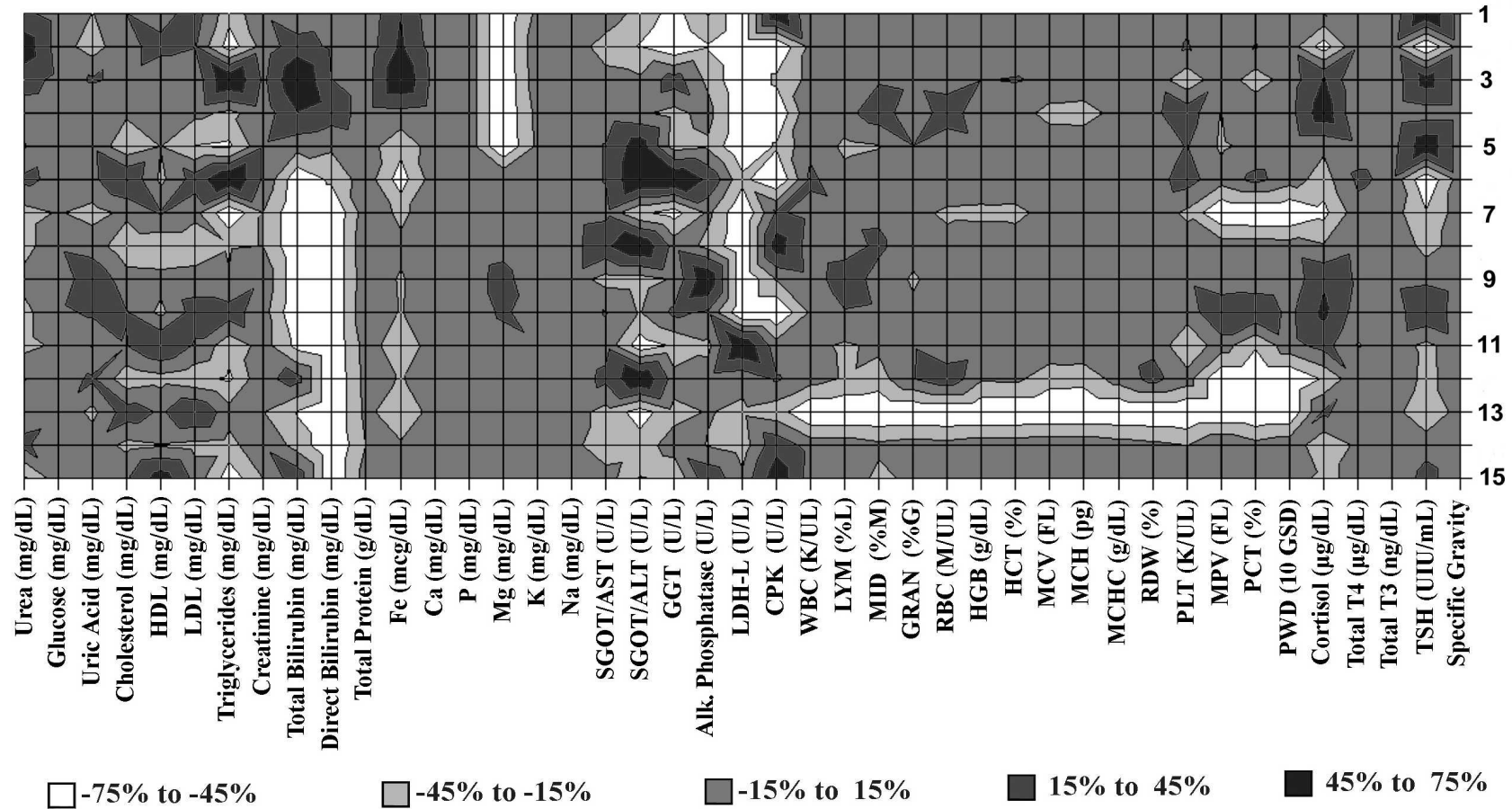
Σημειώνεται ότι στα διαγράμματα δεν παρουσιάζονται όλες οι ουσίες που έχουν ανιχνευθεί ποιοτικά αλλά:

1. Ουσίες οι οποίες είχαν τριπλάσια απόκλιση από το τυφλό
2. Ουσίες οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ως φυσιολογικές μετά την στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων
3. Ουσίες οι οποίες είχαν εμφανίσει σε περισσότερα από 1 δείγματα κα με αξιόλογη ευαισθησία.

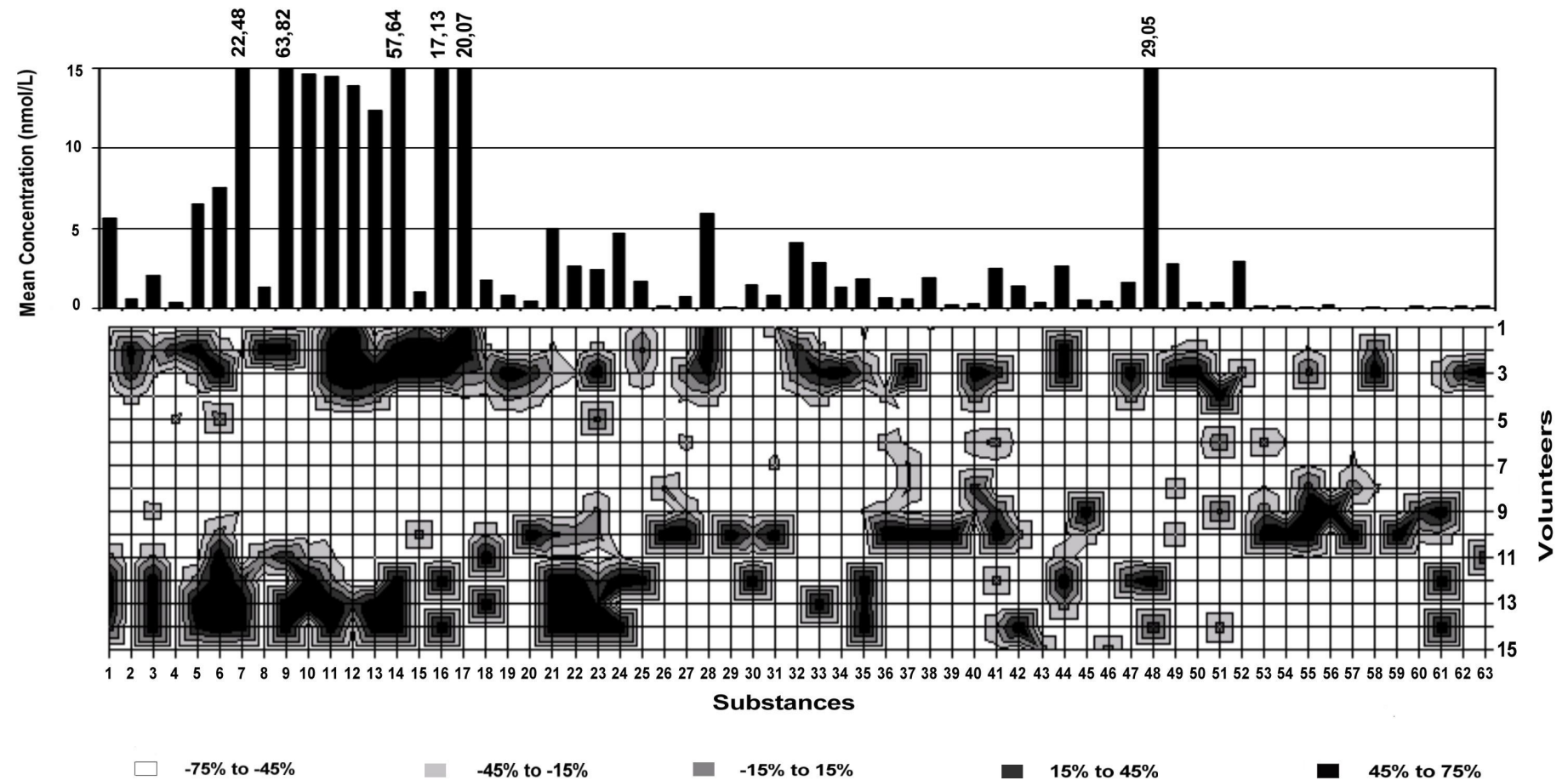
Η ανθρώπινη αναπνοή είναι μια δυναμική διαδικασία και τα VOCs που ανιχνεύονται αλλάζουν συνεχώς ανάλογα με τη φυσική, φυσιολογική υπόσταση και

το περιβάλλον επαφής των ατόμων που εξετάζονται. Προκειμένου να εξασφαλιστεί ο όρος “φυσιολογικός” εθελοντής, για κάθε έναν από τους 15 εθελοντές πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές εξετάσεις με μέτρηση 63 μεταβλητών (π.χ χοληστερόλης, σακχάρου, ουρίας κ.α) που παρουσιάζονται στο Σχ.6.1.

Η ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα των 15 εθελοντών κατέληξε στην ποσοτική ανάλυση 63 VOCs διαφορών κατηγοριών όπως αλκοόλες, υδρογονάνθρακες, αρωματικές ενώσεις. Στο Σχ. 6.2 εμφανίζονται οι ενώσεις που προσδιορίστηκαν στον εκπνεόμενο αέρα ενώ ο πίνακας 6.1 εμφανίζει επακριβώς τις ποσότητες των ουσιών που προσδιορίστηκαν. Επιπλέον η διακύμανση που εμφανίζεται σε διαφορετικά δείγματα εκπνεόμενου αέρα για τον ίδιο εθελοντή εξετάστηκε με την ανάλυση τριών δειγμάτων του ίδιου εθελοντή. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν εμφάνισαν διακύμανση των VOCs της τάξης του 70% ενώ η ποιοτική πληροφορία, που αφορά το είδος των ουσιών που προκύπτουν σε κάθε χρωματογράφημα εμφανίζει αναλογία κατά 97%.



Σχήμα 6.1: Αποτελέσματα Βιοχημικών Εξετάσεων Αίματος και Ούρων, 15 εθελοντών ομάδας αναφοράς.



Σχήμα 6.2: Πτητικές οργανικές ενώσεις που προσδιορίστηκαν στον εκπνεόμενο αέρα 15 φυσιολογικών εθελοντών. Κάθε αριθμός αντιπροσωπεύει μια συγκεκριμένη ουσία η δομή της οποίας παρουσιάζεται στον πίνακα 6.1

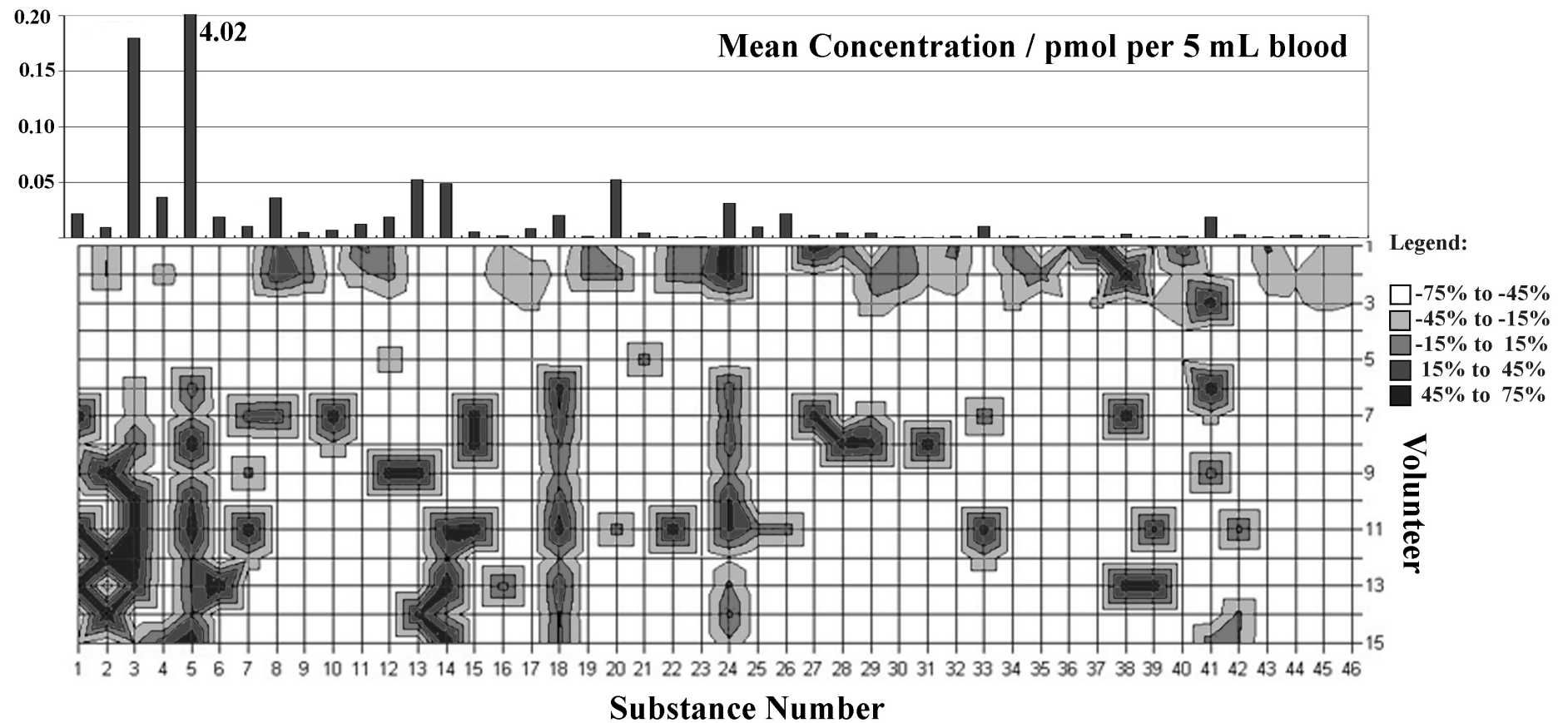
Πίνακας 6.1: VOCs που ανιχνεύθηκαν στον εκπνεόμενο αέρα «φυσιολογικών» εθελοντών.

VOCs	Μέση συγκέντρωση (nmol / L)	% Εμφάνιση
1. Methane, chloro-	1,99	91
2. 1-Propene, 2-methyl	0,49	27
3. Acetaldehyde	0,92	91
4. Butane, 2-methyl	0,39	18
5. Pentane	3,64	73
6. Isoprene	4,91	100
7. Ethanol	6,25	64
8. Propanol-2	1,33	36
9. Acetone	48,67	100
10. Acetic Acid, methyl ester	4,50	54
11. Pentane, 2-methyl	9,94	100
12. Pentane, 3-methyl	15,01	73
13. 1-Pentene, 2-methyl	4,25	100
14. Hexane	21,55	100
15. Pentane, 2,4-dimethyl	1,33	27
16. Propane, 2-ethoxy-2-methyl	8,62	54
17. Cyclopentane, methyl	24,04	36
18. Carbonic Acid, dimethyl ester	1,27	73
19. 1,3-Cyclohexadiene	0,44	18
20. Pentane, 2,3-dimethyl	0,45	27
21. Hexane, 3-methyl	2,32	100
22. Hexane, 2-methyl	1,10	82
23. Benzene	1,64	91
24. Pentane, 2,2,4-trimethyl	1,20	36
25. 2-Butanol, 2-methyl	1,36	27
26. Cyclopentane, 1,2-dimethyl	0,17	27
27. 1-Pentene, 3-ethyl	0,83	45
28. 1-Pentene, 2,2,4-trimethyl	6,52	36
29. Ethene, trichloro	0,13	9
30. Acetic Acid	0,76	36
31. Cyclohexane, methyl	1,06	27
32. 3-Hexene, 2,2-dimethyl	3,84	18
33. Hexane, 2,2-dimethyl	1,68	36
34. 1-Butanol, 2-ethyl	0,34	9
35. Hexane, 2,3-dimethyl	0,68	82
36. Heptane, 2-methyl	0,72	27
37. Heptane, 3-methyl	0,58	36
38. Heptane, 4-methyl	1,91	27
39. 2-Pentanone, 4-methyl	0,44	9
40. Cyclohexane, 1,2-dimethyl	0,23	36
41. Toluene	2,61	73
42. Octane	1,35	18
43. Heptane, 4,4-dimethyl	0,39	9
44. Heptane, 2,4-dimethyl	1,14	91
45. Tetrachloroethene	0,66	27
46. Hexanal	0,45	9
47. Heptane, 2,2-dimethyl	1,14	45

48. 1-Pentanol, 3,4-dimethyl	3,92	27
49. 1-Heptene, 5-methyl	1,33	45
50. Heptane, 2,3-dimethyl	0,17	18
51. Octane, 4-methyl	0,59	27
52. Hexane, 3-ethyl	2,97	9
53. Octane, 3-methyl	0,22	27
54. Benzene, ethyl	0,30	9
55. Alpha-pinene	0,11	82
56. Cyclohexanone	0,27	18
57. 2-Beta pinene	0,04	18
58. Nonane, 2,6-dimethyl	0,07	18
59. Benzene, 1-ethyl, 3-methyl	0,06	9
60. Benzene, 1,2,3-trimethyl	0,12	18
61. di-Limonene	0,09	54
62. Undecane, 4,6-dimethyl	0,07	9
63. Decane, 2,4,6-trimethyl	0,12	27

Ανάλογα οι ουσίες που προσδιορίστηκαν στο αίμα και τα ούρα των εθελοντών ήταν 46 και 38 αντίστοιχα. Χημικά εμφάνισαν την ίδια διακύμανση και ανομοιογένεια όσων αφορά την σύσταση τους. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εμφανίζονται στα σχήματα και τους πίνακες που ακολουθούν.

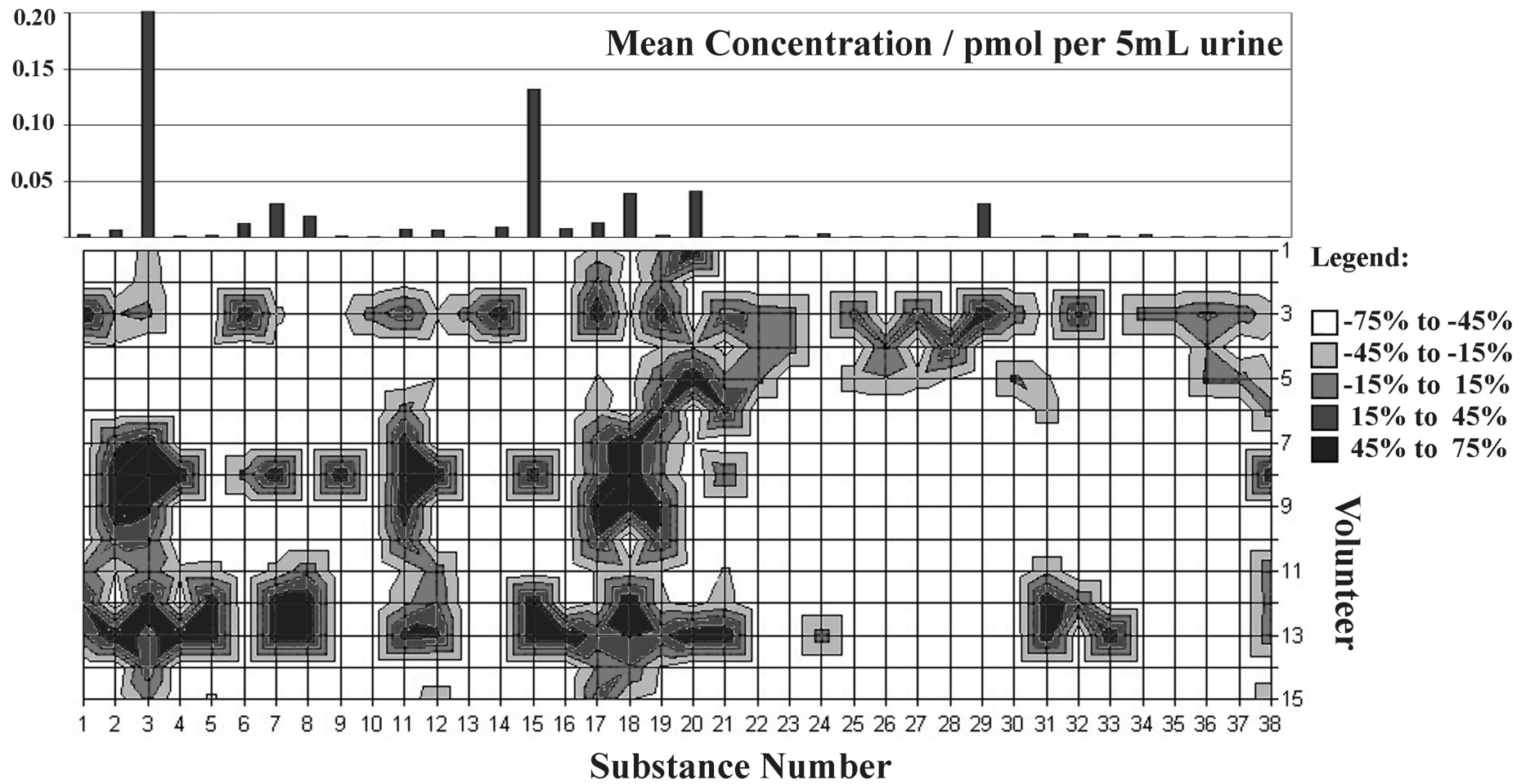
Πρέπει να σημειωθεί πως για τον έλεγχο της σταθερότητας των δειγμάτων και της επαναληψιμότητας της μεθόδου πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις διπλών δειγμάτων που είχαν διατηρηθεί σε βαθιά κατάψυξη για 30 ημέρες. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ανάλογα αποτελέσματα με αυτά που είχαν εξεταστεί αρχικά κατά 90% για τα ούρα και κατά 80% για το αίμα.



Σχήμα 6.3: Πτητικές οργανικές ενώσεις στη υπερκείμενη φάση δειγμάτων αίματος “φυσιολογικών” εθελοντών. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν τις πτητικές οργανικές ενώσεις που προσδιορίστηκαν και αναφέρονται στο πίνακα 6.2

Πίνακας 6.2: VOCs στην υπερκείμενη φάση αίματος “φυσιολογικών” εθελοντών

VOCs	Μέση Συγκέντρωση ($\times 10^{-3}$ $\mu\text{mol} / 5\text{mL}$)	% Εμφάνιση
1. Butane, 2-methyl	21,22	64
2. Ethanol	5,76	45
3. Isoprene	189,57	82
4. Ethane, 1,1-oxybis	36,49	18
5. Acetone	4120,92	100
6. Dichloromethane	25,67	18
7. Pentane, 3-methyl	10,04	36
8. Hexane	32,54	27
9. Propane, 2,2-oxybis	5,13	18
10. Cyclopentane, methyl	4,12	18
11. Propanamide, 2-methyl	12,33	18
12. Acetic acid ethyl ester	16,62	36
13. 2-Butanone	52,41	36
14. Chloroform	58,07	63
15. Cyclohexane	4,67	54
16. Tetrachloromethane	1,59	27
17. Benzene	4,82	18
18. Butane, 2,2,3,3-tetramethyl	18,63	100
19. Heptane	1,56	18
20. Acetic acid	52,59	27
21. 2-Pentanone	4,68	9
22. Heptane, 4-methyl	0,99	27
23. 2-Pentanone, 4-methyl	1,14	18
24. Toluene	29,81	100
25. Heptane, 2,6-dimethyl	9,63	9
26. 1-Heptene, 5-methyl	21,78	9
27. Benzene, ethyl	1,91	27
28. m-Xylene	4,33	27
29. p-Xylene	3,36	36
30. o-Xylene	1,21	18
31. Alpha pinene	0,69	27
32. Ethanol, 2-butoxy	1,44	18
33. Cyclohexanone	16,96	9
34. Decane	1,03	27
35. Benzene, 1-ethyl, 2-methyl	0,49	9
36. Benzene 1,2,4-trimethyl	1,41	9
37. Benzaldehyde	1,21	27
38. 2(3H)-Furanone, dihydro	2,49	36
39. di-Limonene	0,81	36
40. Undecane	0,97	36
41. Phenol	8,63	82
42. Benzene, 4-ethyl-1,2-dimethyl	3,04	27
43. Ethanone 1-phenyl	0,62	18
44. Nonanal	1,33	9
45. Decanal	1,34	18
46. Naphthalene	0,47	18



Σχήμα 6.4: Πτητικές οργανικές ενώσεις στη υπερκείμενη φάση δειγμάτων ούρων “φυσιολογικών” εθελοντών. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν τις πτητικές οργανικές ενώσεις που προσδιορίστηκαν και αναφέρονται στο πίνακα 6.3

Πίνακας 6.3 : VOCs στην υπερκείμενη φάση δειγμάτων ούρων “φυσιολογικών” εθελοντών

VOCs	Μέση Συγκέντρωση ($\times 10^{-3}$ $\mu\text{mol} / 5\text{mL}$)	% Εμφάνιση
1. Ethane, 1,1-oxybis	2,62	54
2. Ethanol	6,56	82
3. Acetone	548,52	100
4. Dichloromethane	1,07	27
5. Pentane, 3-methyl	3,13	54
6. Hexane	13,33	45
7. 2-Butanone	56,01	91
8. Chloroform	10,57	82
9. Cyclohexane	3,50	27
10. Tetrachloromethane	0,65	36
11. Benzene	7,18	91
12. Hexane, 2,2-dimethyl	6,02	100
13. Heptane	0,90	18
14. Acetic acid	9,86	36
15. 2-Pentanone	91,23	91
16. Disulfide, dimethyl	7,35	18
17. Toluene	14,28	100
18. 1-H Pyrrole	34,92	100
19. p-Xylene	2,14	100
20. 4-Heptanone	36,30	91
21. o-Xylene	0,60	64
22. Styrene	0,42	27
23. Ethanol, 2-butoxy	0,97	27
24. Cyclohexanone	3,47	9
25. Benzene, 1-ethyl, 3-methyl	0,77	9
26. Decane	1,34	27
27. Benzene 1,2,4-trimethyl	0,64	18
28. Benzaldehyde	0,79	36
29. 2(3H)-Furanone, dihydro	12,23	73
30. di-Limonene	0,31	36
31. Methane, sulfonylbis	1,81	73
32. 1-Hexanol, 2-ethyl	4,70	27
33. Benzene, 4-ethyl-1,2-dimethyl	1,84	36
34. Phenol	1,83	82
35. Ethanone 1-phenyl	0,78	27
36. Decanal	0,59	36
37. Naphthalene	0,28	18
38. 1,2,4 Metheneazulene, decahydro, 1,5,5	0,53	100

6.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

1. Η ουσία που εμφανίζει τα μεγαλύτερες τιμές συγκέντρωσης και στις τρεις βιολογικές εκκρίσεις είναι η ακετόνη.
2. Ο κοινός πυρήνας των ενώσεων που εμφανίζονται πάνω από το 80% σε δείγματα εκπνεόμενου αέρα “φυσιολογικών” εθελοντών εμφανίζεται στον πίνακα 6.4. Επειδή η ουσία που είναι κυρίαρχη είναι η ακετόνη στον πίνακα εμφανίζεται μια στήλη με τιμές που αφορούν τον λόγο των συγκεντρώσεων των ουσιών αυτών σε σύγκριση με την συγκέντρωση της ακετόνης.

Πίνακας 6.4: VOCs που έχουν προσδιοριστεί σε περισσότερο από το 80% των δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα.

VOCs	Ποσοστό Εμφάνισης (%)	Σχετική απόκριση σε σχέση με την Ακετόνη (%)
Acetone	100	100
Pentane, 2-methyl	100	58,2
Hexane	100	53,2
Isoprene	100	33,4
1-Pentene, 2-methyl	100	27,0
Hexane, 3-methyl	100	17,0
Methane, chloro-	93	11,9
Benzene	93	11,5
Heptane, 2,4-dimethyl	93	9,14
Hexane,2-methyl	87	8,38
Acetaldehyde	93	7,86
Hexane 2,3-dimethyl	87	4,79
Alpha pinene	87	0,43

3. Ανάλογα για τα δείγματα του αίματος, οι κοινές ουσίες που εμφανίζονται σε ποσοστό πάνω από 80% των δειγμάτων αφορούν τις ενώσεις του πίνακα 6.5.

Πίνακας 6.5: VOCs που έχουν προσδιοριστεί σε περισσότερο από το 80% των δειγμάτων αίματος (υπερκείμενη φάση).

VOCs	Ποσοστό Εμφάνισης (%)	Σχετική απόκριση σε σχέση με την Ακετόνη (%)
Acetone	100	100
Isoprene	87	4,6
Butane, 2,2,3,3-tetramethyl	100	0,45
Toluene	100	0,24
Phenol	80	0,21

4. Τέλος για τα δείγματα των ούρων, οι κοινές ουσίες που εμφανίζονται σε ποσοστό πάνω από το 80% των δειγμάτων που έχουν αναλυθεί αφορούν τις ενώσεις του πίνακα 6.6.

Πίνακας 6.6: VOCs που έχουν προσδιοριστεί σε περισσότερο από το 80% των δειγμάτων ούρων (υπερκείμενη φάση).

VOCs	Ποσοστό Εμφάνισης (%)	Σχετική απόκριση σε σχέση με την Ακετόνη (%)
Acetone	100	100
2-Pentanone	87	15,3
4-Heptanone	87	6,86
1H-pyrrole	100	6,37
2-butanone	87	2,80
Toluene	100	2,60
Benzene	93	1,31
Ethanol	87	1,20
Hexane 2,2 dimethyl	100	1,01
p-Xylene	100	0,39
Phenol	87	0,28

5. Γίνεται φανερό από τους παραπάνω πίνακες πως πέρα από την ακετόνη ο εντοπισμός της ανθρώπινης παρουσίας μπορεί να ενισχυθεί από τον προσδιορισμό του ισοπρενίου, που εντοπίζεται στον εκπνεόμενο αέρα και τα ούρα με λόγο συγκέντρωσης προς την ακετόνη κοντά στο 10-30%.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Β΄ ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

7.1 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της δεύτερης σειράς μετρήσεων υπήρξε ο προσδιορισμός των πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs) που εμφανίζονται στον εκπνεόμενο αέρα εθελοντών με έντονο στρες και συσχέτιση των ουσιών που εμφανίζονται με τις μεταβολικές διεργασίες που εμφανίζονται στην κατάσταση εγκλωβισμού που προσομοιάζει.

7.2 ΟΜΑΔΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ ΜΕ ΕΝΤΟΝΟ ΣΤΡΕΣ

Σε 15 υγιείς άρρενες εθελοντές (μέση ηλικία 24) πραγματοποιήθηκαν λήψεις εκπνεόμενου αέρα για την μελέτη του πτητικού οργανικού προφίλ ενώσεων που παρουσιάζουν. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε με την συνεργασία την Πολεμικής Αεροπορίας και συγκεκριμένα με την 124 ΠΒΕ, Τριπόλεως. Η ομάδα των 15 εθελοντών αποτελούνταν από νεοκατατεγέντες στρατιώτες. Η επιλογή της ομάδας των εθελοντών βασίστηκε στην παραδοχή της προσομοίωσης της με τις μεταβολικές διαδικασίες που εμφανίζονται στην κατάσταση εγκλωβισμού τύπου Α₁ μέχρι 24 ώρες.

Αρχικά οι 15 εθελοντές έδωσαν ατομική συνέντευξη στους ιατρούς που συμμετείχαν στην έρευνα αντίστοιχα με ότι πραγματοποιήθηκε για την ομάδα αναφοράς. Οι πληροφορίες αυτές καταγράφηκαν σε ηλεκτρονικό αρχείο προκειμένου να αξιοποιηθούν αργότερα στα πλαίσια της έρευνας.

Το ψυχολογικό προφίλ των εθελοντών ελέγχθηκε με την εφαρμογή ψυχομετρικών τεστ κατά αναλογία με την ομάδα αναφοράς και η δειγματοληψία βασίστηκε στα πρωτόκολλα α) «Πρωτόκολλο ηθικής και δεοντολογίας για ιατρικά πειράματα- Διακήρυξη της Χαβάης» και β) την σχετική «Συμφωνία για εθελοντική συμμετοχή».

Τέλος σε όλους τους εθελοντές πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές αναλύσεις σε συνεργασία με το Περιφερειακό Νοσοκομείο Τριπόλεως.

7.3 ΥΛΙΚΑ-ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ-ΜΕΘΟΔΟΣ

7.3.1 Υλικά Συλλογής Δειγμάτων Εκπνεόμενου Αέρα

Για τις αναλύσεις των δειγμάτων του εκπνεόμενου αέρα χρησιμοποιήθηκαν:

- Σακούλες δειγματοληψίας αερίων Tedlar (size 12×12'', vol. 5L, Alltech Assoc. USA).
- Προσροφητικές παγίδες (διαστάσεων 6 mm od, 4 mm id και 115 mm μήκος), τύπου TD-300, τριών προσροφητικών στρωμάτων (300 mgr, mesh size 60/80 Carbograph 2, + 200 mgr, mesh size 20/40 Carbograph 1+ 125 mgr, mesh size 20/40 Carboshieve S-III), (Alltech Assoc. USA).
- Αντλία Buck-Genie, μοντέλο VSS-1, ροής 5-600 cc/min, της A. P. Buck Inc.
- Αέριο He για την αναγέννηση των προσροφητικών παγίδων
- Ειδικά παρεμβύσματα για την αποθήκευση των VOCs στις προσροφητικές παγίδες (1/4 '' nut brass, 1/4 '' cap brass και 1/4 '' teflon ferrules, Alltech Assoc. USA).

- Πρότυπο μεθανολικό διάλυμα Chlorobenzene d-5 (συγκέντρωση 50 mmol/L) (IT-Chem Hellas) σαν εσωτερικό πρότυπο.
- Φορητό ψυγείο μεταφοράς προσροφητικών παγίδων

7.3.2 Οργανολογία Ανάλυσης Δειγμάτων Εκπνεόμενου Αέρα

Η ανάλυση των δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα πραγματοποιήθηκε με σύστημα Θερμικής Εκρόφησης συζευγμένο με Αέριο Χρωματογράφο και Φασματοόμετρο Μάζας (TDU/GC/MS) (TDU, τμήμα Χημικών Μηχανικών, Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας, ΕΜΠ), (GC/MS, HP 5890/5972, Agilent Technologies).

Κατά την εκρόφηση η ροή He ήταν ρυθμισμένη στα 30 ml/min ενώ η θερμοκρασία της εκρόφησης ήταν σταθερή στους 200 °C. Για την ψυχρή επανεστίαση των πτητικών οργανικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η τριχοειδής στήλη AT-Q (0.53 mm id, 22 cm μήκος, με 9 μm film thickness of porous divinylbenzene polymer, Alltech Assoc. USA). Η διαδικασία της εκρόφησης και επανεστίασης διήρκεσε 20 λεπτά. Μετά το πέρας των 20 λεπτών, ακολούθησε ταχύτατη θέρμανση της κρυοπαγίδας (20 sec) για την ακαριαία είσοδο των παγιδευμένων πτητικών ενώσεων στην χρωματογραφική στήλη του GC.

Η πίεση στην κεφαλή της στήλης ρυθμίστηκε στα 25 psi Η χρωματογραφική στήλη διαχωρισμού που χρησιμοποιήθηκε είναι η SPB-624 (60m, 0.25 mm ID, 1.4 μm film thickness, Supelco). Ενώ ο θερμοπρογραμματισμός του φούρνου του GC ήταν ως ακολούθως: 35 °C για 5 min, αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι τους 180 °C με ρυθμό ανόδου τους 4 °C/min και παραμονή για 20 min. Το εύρος μαζών που εξετάστηκαν από το MSD ήταν μεταξύ 42-350 amu, με τιμή σκαναρίσματος τα 1,8 scan/sec.

7.3.3 Μέθοδος

Η ομάδα των εθελοντών αποτελούνταν από νεοκατατεγέντες στρατεύσιμους, την τρίτη μέρα παρουσίας τους στην Βασική Μονάδα Εκπαίδευσης, στην Τρίπολη. Οι εθελοντές χωρίστηκαν σε ομάδες των 2 ατόμων και οι δειγματοληψίες έγιναν την ίδια ημέρα για το σύνολο και των 15 εθελοντών. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων συνεργάστηκαν από κοινού το τμήμα Χημικών Μηχανικών (τομέας Ι) του Ε.Μ.Π, το Αιγινήτειο Νοσοκομείο και η 124 ΠΒΕ Αεροπορίας, Τριπόλεως. Την όλη ευθύνη, το συντονισμό της έρευνας ανέλαβε το Ε.Μ.Π.

Τα δείγματα του εκπνεόμενου αέρα λήφθηκαν με παγίδευση σε κατάλληλη προσροφητική παγίδα, μετά από συγκέντρωσή τους σε σακούλες Tedlar. Οι εθελοντές εκπνέουν, μέσα στην σακούλα δειγματοληψίας ενώ εισπνέουν από την μύτη. Επιπλέον δείγματα αέρα του χώρου δειγματοληψίας του εκπνεόμενου αέρα λαμβάνονται για κάθε ομάδα εθελοντών. Η μεταφορά των δειγμάτων σε αναγεννημένες προσροφητικές παγίδες έγινε με την βοήθεια αντλίας, με ροή δειγματοληψίας τα 200 ml/min. Οι προσροφητικές παγίδες εμβολιάστηκαν πριν την μεταφορά των δειγμάτων, με 1 μL εσωτερικού πρότυπου (Chlorobenzene D-5). Ενώ, η αναγέννηση των παγίδων πραγματοποιήθηκε με τις ίδιες συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την δειγματοληψία της ομάδας αναφοράς. Μετά την μεταφορά των ουσιών στις προσροφητικές παγίδες αυτές σφραγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε φορητό ψυγείο. Δείγματα προσροφητικών παγίδων ανάλογα με αυτά της δειγματοληψίας του εκπνεόμενου αέρα λήφθηκαν για τις ίδιες συνθήκες μεταφοράς και αποθήκευσης των παγίδων των δειγμάτων πριν και μετά την δειγματοληψία.

Μετά την μεταφορά τους στο εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του ΕΜΠ αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο μέχρι την ανάλυση τους.

Η αναγνώριση των χρωματογραφικών κορυφών που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων του εκπνεόμενου αέρα έγινε με την βοήθεια της βιβλιοθήκης φασμάτων μάζας Wiley 138 του οργάνου και για ποσοστά ομοιότητας πάνω από 70% αντίστοιχα με την ομάδα αναφοράς και την χρήση του “Easy ID”.

7.4 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

7.4.1 Κυψελιδική Κλίση (Alveolar Gradient)

Η προέλευση των VOCs στην ανθρώπινη εκπνοή, το κατά πόσο δηλαδή προέρχονται από τον ανθρώπινο οργανισμό ή είναι τεχνητό προϊόν της ανάλυσης ή προέρχεται από τον αέρα του δωματίου, είναι ένα δίλημμα για τους επιστήμονες του χώρου. Οι στρατηγικές που έχουν υιοθετηθεί για την αντιμετώπιση του προβλήματος είναι οι ακόλουθες:

- Να αγνοούν το πρόβλημα. Ένας αριθμός δημοσιεύσεων αναφέρει συγκεντρώσεις VOCs που έχουν παρατηρηθεί απλά στην εκπνοή.
- Η παροχή για αναπνοή, απαλλαγμένου από VOCs αέρα, στο προς μελέτη υποκείμενο, πριν την συλλογή δείγματος αέρα εκπνοής από αυτό. Η διαδικασία αυτή είναι λογική ωστόσο πρακτικά είναι σχεδόν αδύνατο να επιτευχθεί αφού ακόμα και υψηλής καθαρότητας αέρας, από εμπορικές πηγές συχνά περιέχουν αρκετά μεγάλο αριθμό VOCs σε συγκεντρώσεις της τάξης των picomole.
- Διόρθωση του προβλήματος με αφαίρεση των VOCs του περιβάλλοντος του αέρα του δωματίου από τα VOCs που παρατηρούνται στην εκπνοή.

Στις μετρήσεις που εμφανίζονται στην παρούσα διατριβή εφαρμόστηκε η τρίτη προσέγγιση του φαινομένου αυτή δηλαδή της αφαίρεσης των VOCs του περιβάλλοντος.

Για το σύνολο των μετρήσεων που ακολουθούν επιλέχθηκε σαν τρόπος παρουσίασης των αποτελεσμάτων η κυψελιδική κλίση (Alveolar Gradient) [Phillips M. et al. 1999]. Η επιλογή της κυψελιδικής κλίσης για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων παρέχει μια λογική και κυρίως σταθερή προσέγγιση για την αντιστάθμιση της επίδρασης των VOCs του περιβάλλοντος χώρου. Επιπροσθέτως, η κυψελιδική κλίση παρέχει μια σημαντική ματιά στην κινητική των VOCs στο ανθρώπινο σώμα, γιατί μεταβάλλεται ανάλογα με την διαφορά μεταξύ των ρυθμών σύνθεσης και κάθαρσης των VOCs, και το πρόσημο της δηλώνει ποια από τις δύο διαδικασίες είναι κυρίαρχη ή υπερισχύει.

Η σχέση που παρουσιάζει τον τρόπο υπολογισμού της κυψελιδικής κλίσης για τις διάφορες ενώσεις δίνεται παρακάτω:

$$\text{Κυψελιδική Κλίση} = \frac{E_{\text{voc στην εκπνοή}}}{E_{\text{εσωτερικού προτύπου}}} - \frac{E_{\text{voc στον αέρα}}}{E_{\text{εσωτερικού προτύπου}}} \quad [7.1]$$

Όπου:

Ε_νο_ς στην εκπνοή είναι το εμβαδόν της χρωματογραφικής κορυφής για την ουσία που προσδιορίζεται η κυψελιδική κλίση.

Ε_νο_ς στον αέρα το εμβαδόν της χρωματογραφικής κορυφής της ίδιας ουσίας στον αέρα περιβάλλοντος και

Ε_{εσωτερικού προτύπου} το εμβαδόν της χρωματογραφικής κορυφής του εσωτερικού προτύπου για την κάθε προσροφητική παγίδα που αναλύεται.

Η τεκμηρίωση της εφαρμογής της κυψελιδικής κλίσης στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων αναλύεται πιο κάτω.

Τα VOCs εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό είτε μέσω του αναπνεόμενου αέρα ή από την σύνθεση τους από τον ίδιο τον οργανισμό (η πρόσληψη τους από τις τροφές θεωρείται αμελητέα). Τα VOCs απομακρύνονται από το ανθρώπινο σώμα είτε μέσω της κάθαρσης (μεταβολισμός ή και απέκκριση) ή αλλιώς μέσω της εκπνοής. Αν τα VOCs δεν συντίθενται ούτε απομακρύνονται από τον ανθρώπινο οργανισμό τότε η ποσότητα των πτητικών που υπάρχουν στην εκπνοή θα πρέπει να ισούται με την ποσότητα που υπάρχει στον αναπνεόμενο αέρα και έτσι η τιμή της κυψελιδικής κλίσης θα είναι μηδέν. Αν τα VOCs *συντίθεται* στον ανθρώπινο οργανισμό αλλά δεν απομακρύνονται τότε η ποσότητα που θα βρίσκεται στην εκπνοή θα είναι μεγαλύτερη από αυτή που θα υπάρχει στον αναπνεόμενο αέρα κι έτσι η τιμή της *κυψελιδικής κλίσης* θα έχει *θετικό πρόσημο*. Αντίθετα, αν τα VOCs *απομακρύνονται* από τον οργανισμό αλλά δεν συντίθενται τότε θα υπάρχει λιγότερη ποσότητα στην εκπνοή από αυτή που θα υπήρχε στον εισπνεόμενο αέρα με αποτέλεσμα το *πρόσημο της κυψελιδικής κλίσης να είναι αρνητικό*. Συνεπώς αν ένα VOC *συντίθεται και απομακρύνεται* αμφοτέρωθεν από τον ανθρώπινο οργανισμό, η τιμή της κυψελιδικής κλίσης θα μεταβάλλεται ανάλογα με την επίδραση που θα έχει ο συνδυασμός τους. *Θετικό πρόσημο* αν η σύνθεση είναι μεγαλύτερη από την απομάκρυνση ή *αρνητικό πρόσημο* αν η απομάκρυνση είναι μεγαλύτερη από την σύνθεση.

7.4.2 Αποτελέσματα Δειγμάτων Εκπνεόμενου Αέρα

Ένα τυπικό χρωματογράφημα εκπνεόμενου αέρα της ομάδας των εθελοντών με έντονο στρες εμφάνισε περισσότερες από 100 ενώσεις. Οι ουσίες ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκε η κυψελιδική κλίση τους. Στην συνέχεια για το σύνολο των δειγμάτων διαχωρίστηκαν σε αυτές που εμφάνιζαν θετική κυψελιδική κλίση και σε αυτές με αρνητική κυψελιδική κλίση. Στους πίνακες 7.1 και 7.2 εμφανίζονται οι ενώσεις που προσδιορίστηκαν για το 80% των δειγμάτων με την τιμή της μέσης κυψελιδικής κλίσης.

Πίνακας 7.1: VOCs στον εκπνεόμενο αέρα εθελοντών με έντονο στρες και θετική κυψελιδική κλίση

VOCs	Μέση κυψελιδική κλίση ($\times 10^{-2}$)	% Εμφάνιση
1. Acetone	10,99	100
2. Isoprene	3,49	90
3. Ethanol	1,92	90
4. Pentane	0,54	80
5. Hexane	0,31	100
6. Pentane, 2-methyl	0,30	100
7. Pentane, 3-methyl	0,22	80
8. Hexane, 3-methyl	0,21	100
9. Pentane, 2,3-dimethyl	0,13	80
10. Hexane, 2-methyl	0,13	90
11. Hexane, 2,3-dimethyl	0,13	90
12. Benzene	0,12	100
13. Hexane, 2,2-dimethyl	0,11	80
14. Heptane, 3-methyl	0,11	100
15. Heptane, 4-methyl	0,11	100
16. Octane	0,09	80
17. Toluene	0,07	90
18. di-Limonene	0,002	90
19. 2-Beta pinene	0,001	100

Πίνακας 7.2: VOCs στον εκπνεόμενο αέρα εθελοντών με έντονο στρες και αρνητική κυψελιδική κλίση

VOCs	Μέση κυψελιδική κλίση ($\times 10^{-2}$)	% Εμφάνιση
1. Methane, chloro-	-2,99	100
2. Cyclopentane, methyl	-2,04	90
3. 1,3-Cyclohexadiene	-0,44	90
4. Cyclohexane 1,2,3 trimethyl	-0,42	80
5. Cyclopentane, 1,2-dimethyl	-0,37	90
6. Ethene, trichloro	-0,35	80
7. Undecane	-0,31	100
8. Cyclohexane, methyl	-0,30	100
9. Cyclohexane, 1,2-dimethyl	-0,23	100
10. Tetrachloroethene	-0,15	100
11. Hexanal	-0,07	90
12. Benzene, ethyl	-0,02	90
13. Cyclohexanone	-0,01	90
14. Benzene, 1-ethyl, 3-methyl	-0,01	90
15. Benzene, 1,2,3-trimethyl	-0,002	80
16. Benzene 1,2,4-trimethyl	-0,001	80

7.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

1. Το σύνολο των κοινών ουσιών που εμφανίζονται στον εκπνεόμενο αέρα των εθελοντών με έντονο στρες είναι σαφώς μεγαλύτερο από εκείνο της ομάδας αναφοράς. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι στην πρώτη περίπτωση οι κοινές ουσίες ήταν στο σύνολο τους 13 έναντι 36 (θετική και αρνητική κυψελιδική κλίση).
2. Η ουσία που εμφανίζει την μεγαλύτερη θετική κυψελιδική κλίση είναι η ακετόνη, ενώ το ισοπρένιο και η αιθανόλη έπονται.
3. Στο προφίλ των ουσιών που εμφανίζονται για την ομάδα των εθελοντών, εστιάζοντας στις ενώσεις με θετική κυψελιδική κλίση παρατηρούμε την παρουσία μεγαλύτερου αριθμού υδρογονανθράκων σε σχέση με τις ενώσεις της ομάδας αναφοράς. Στο σύνολο τους οι υδρογονάνθρακες είναι αλκάνια, χωρίς ή με μία ή δύο διακλαδώσεις. Ο αριθμός των ανθράκων κυμαίνεται από (C₅-C₈) με τις ενώσεις του πεντανίου και του εξανίου να κυριαρχούν.
4. Η εμφάνιση των υδρογονανθράκων στις ενώσεις του εκπνεόμενου αέρα δικαιολογείται λόγω του έντονου στρες των εθελοντών. Βιβλιογραφικά δεδομένα έχουν συνδέσει την παρουσία μεθυλιωμένων κυρίως υδρογονανθράκων με την παρουσία οξειδωτικού στρες. Ειδικότερα η εμφάνιση του πεντανίου και του ισοπρενίου στην ανθρώπινη εκπνοή έχει συνδεθεί με την υπεροξειδωση των λιπιδίων.
5. Οι κοινές ενώσεις που εμφανίζουν αρνητική κυψελιδική κλίση και αφορούν ουσίες που χαρακτηρίζονται ως εξωγενής περιλαμβάνουν κυρίως ενώσεις του βενζολίου και κυκλικές ενώσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Γ' ΣΕΙΡΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

8.1 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της τρίτης σειράς μετρήσεων υπήρξε ο προσδιορισμός των πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs) που εμφανίζονται στον εκπνεόμενο αέρα εθελοντών με αποχή από την λήψη τροφής και νερού για διάστημα τριών ημερών [Statheropoulos M., et al. 2006a].

8.2 ΟΜΑΔΕΣ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ ΜΕ ΑΠΟΧΗ ΑΠΟ ΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΝΕΡΟ

Προκειμένου για την πειραματική προσέγγιση της κατάστασης εγκλωβισμού του τύπου A₂ (μετά από 24 ώρες), επιλέχθηκαν δύο ομάδες εθελοντών σε διαφορετικές χρονικές περιόδους, που απείχαν αυστηρά από την λήψη τροφής και νερού για τρεις ημέρες.

Η πρώτη αποτελούνταν από 7 μη καπνίζοντες άρρενες μοναχούς (μέση ηλικία 32 και εύρος ηλικιών από 24-37) της Ιεράς και Μεγίστης Μονής Βατοπαιδίου, του Αγίου Όρους. Η δεύτερη ομάδα αποτελούνταν από 15 μη καπνίζουσες γυναίκες μοναχές (μέση ηλικία 30 και εύρος ηλικιών από 25-70) της Ιεράς Μονής Παναγίας Γοργοεπηκόου, στην Μάνδρα Αττικής.

Και στις δύο περιπτώσεις οι εθελοντές ήταν υγιείς χωρίς καμία παθολογική νόσο και δεν λάμβαναν καμία φαρμακευτική αγωγή. Το δείγμα παρουσιάζει σημαντική ομοιογένεια λόγω των κοινών διατροφικών συνηθειών και κοινού τρόπου και χώρου διαβίωσης (μη καπνίζοντες, μη κατανάλωση αλκοόλ, μεικτή δίαιτα κ.α).

8.3 ΥΛΙΚΑ-ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ-ΜΕΘΟΔΟΣ

8.3.1 Υλικά Συλλογής Δειγμάτων Εκπνεόμενου Αέρα

Για τις αναλύσεις των δειγμάτων του εκπνεόμενου αέρα χρησιμοποιήθηκαν:

- Σακούλες δειγματοληψίας αερίων Tedlar (size 12×12'', vol. 5L, Alltech Assoc. USA).
- Προσροφητικές παγίδες (διαστάσεων 6 mm od, 4 mm id και 115 mm μήκος), τριών προσροφητικών στρωμάτων (300 mgr, mesh size 60/80 Carbo-pack C, + 200 mgr, mesh size 60/80 Carbo-pack B + 125 mgr, mesh size 60/80 Carboshieve S-III), (Supelco, USA).
- Φορητή αντλία, ροής 5-300 cc/min
- Αέριο He για την αναγέννηση των προσροφητικών παγίδων
- Ειδικά παρεμβύσματα για την αποθήκευση των VOCs στις προσροφητικές παγίδες (1/4 '' nut brass, 1/4 '' cap brass και 1/4 '' teflon ferrules, Alltech Assoc. USA).
- Πρότυπο μεθανολικό διάλυμα Chlorobenzene d-5 (συγκέντρωση 50 mmol/L) (IT-Chem Hellas) σαν εσωτερικό πρότυπο.
- Φορητό ψυγείο μεταφοράς προσροφητικών παγίδων.

8.3.2 Οργανολογία Ανάλυσης Δειγμάτων Εκπνεόμενου Αέρα

Η ανάλυση των δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα πραγματοποιήθηκε με σύστημα Θερμικής Εκρόφησης συζευγμένο με Αέριο Χρωματογράφο και Φασματοόμετρο Μάζας (TDU/GC/MS) (TDU, τμήμα Χημικών Μηχανικών, Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας, ΕΜΠ), (GC/MS, HP 5890/5972, Agilent Technologies).

Κατά την εκρόφηση η ροή He ήταν ρυθμισμένη στα 30 ml/min ενώ η θερμοκρασία της εκρόφησης ήταν σταθερή στους 220 °C. Για την ψυχρή επανεστίαση των πτητικών οργανικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η τριχοειδής στήλη AT-Q (0.53 mm id, 19 cm μήκος, με 9 μm film thickness of porous divinylbenzene polymer, Alltech Assoc. USA). Η διαδικασία της εκρόφησης και επανεστίασης διήρκεσε 20 λεπτά. Μετά το πέρας των 20 λεπτών, ακολούθησε ταχύτατη θέρμανση της κρυοπαγίδας (20 sec) για την ακαριαία είσοδο των παγιδευμένων πτητικών ενώσεων στην χρωματογραφική στήλη του GC.

Η πίεση στην κεφαλή της στήλης ρυθμίστηκε στα 25 psi Η χρωματογραφική στήλη διαχωρισμού που χρησιμοποιήθηκε είναι η SPB-624 (60m, 0.25 mm ID, 1.4 μm film thickness, Supelco). Ενώ ο θερμοπρογραμματισμός του φούρνου του GC ήταν ως ακολούθως: 35 °C για 5 min, αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι τους 180 °C με ρυθμό ανόδου τους 4 °C/min και παραμονή για 20 min. Το εύρος μαζών που εξετάστηκαν από το MSD ήταν μεταξύ 42-350 amu, με τιμή σκαναρίσματος τα 1,8 scan/sec.

8.3.3 Μέθοδος

Στα πλαίσια του εθιμοτυπικού της ορθόδοξης χριστιανικής θρησκείας, περιλαμβάνεται το «τριμέρι». Το «τριμέρι» αφορά το διάστημα πριν την 40ήμερη νηστεία του Πάσχα (Σαρακοστή), κατά την διάρκεια του οποίου υπάρχει αποχή από την λήψη τροφής και νερού για τρεις μέρες, προκειμένου για την κάθαρση του ανθρώπινου σώματος και πνεύματος. Η νηστεία αρχίζει την Καθαρά Δευτέρα κάθε έτους και ολοκληρώνεται το μεσημέρι της τετάρτης. Κατά την διάρκεια της νηστείας και οι δύο ομάδες εθελοντών απείχαν από χειρωνακτικές εργασίες και εργασιακά καθήκοντα της μονής. Οι ασχολίες τους εστιάζονταν στα καθιερωμένα πνευματικά τους καθήκοντα και αποκλειστικά στον χώρο της μονής. Η διάρκεια της νηστείας ήταν 63 ώρες για τους άνδρες μοναχούς και 70 ώρες για τις γυναίκες μοναχές. Η δειγματοληψία των δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα για την ομάδα των μοναχών της μονής Βατοπαιδίου πραγματοποιήθηκε τον Φεβρουάριο του 2005 ενώ αυτή των μοναχών της μονής Γοργοπηκόου ένα χρόνο μετά το 2006.

Για την ομάδα των ανδρών μοναχών συλλέχθηκαν μονά δείγματα εκπνεόμενου αέρα πριν την λήξη της νηστείας. Ενώ για ένα μοναχό λήφθηκαν δείγματα αέρα κατά την διάρκεια της νηστείας, σε διαστήματα 3, 48 και 63 ωρών. Ενώ τυφλά δείγματα αέρα του περιβάλλοντος χώρου συλλέχθηκαν επίσης.

Για την ομάδα των γυναικών μοναχών ομοίως συλλέχθηκαν μονά δείγματα εκπνεόμενου αέρα μετά το τέλος της νηστείας ενώ για τρεις από αυτές συλλέχθηκαν διπλά δείγματα. Αντίστοιχα με την ομάδα των ανδρών μοναχών, δείγματα του αέρα του χώρου δειγματοληψίας του εκπνεόμενου αέρα συμπεριλήφθησαν στις αναλύσεις.

Τα δείγματα του εκπνεόμενου αέρα λήφθηκαν με παγίδευση σε κατάλληλη προσροφητική παγίδα, μετά από συγκέντρωση τους σε σακούλες Tedlar. Οι εθελοντές εκπνέουν, μέσα στην σακούλα δειγματοληψίας ενώ εισπνέουν από την μύτη. Η μεταφορά των δειγμάτων σε αναγεννημένες προσροφητικές παγίδες έγινε με

την βοήθεια αντλίας, με ροή δειγματοληψίας τα 200 ml/min. Οι προσροφητικές παγίδες εμβολιάστηκαν πριν την μεταφορά των δειγμάτων, με 1 μL εσωτερικού πρότυπου (Chlorobenzene D-5). Ενώ, η αναγέννηση των παγίδων πραγματοποιήθηκε με τις ίδιες συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την δειγματοληψία της ομάδας αναφοράς. Μετά την μεταφορά των ουσιών στις προσροφητικές παγίδες αυτές σφραγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε φορητό ψυγείο. Δείγματα προσροφητικών παγίδων ανάλογα με αυτά της δειγματοληψίας του εκπνεόμενου αέρα λήφθηκαν για τις ίδιες συνθήκες μεταφοράς και αποθήκευσης των παγίδων των δειγμάτων πριν και μετά την δειγματοληψία. Μετά την μεταφορά τους στο εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του ΕΜΠ αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο μέχρι την ανάλυσή τους.

Η αναγνώριση των χρωματογραφικών κορυφών που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων του εκπνεόμενου αέρα έγινε με την βοήθεια της βιβλιοθήκης φασμάτων μάζας Wiley 138 του οργάνου και για ποσοστά ομοιότητας πάνω από 70% αντίστοιχα με την ομάδα αναφοράς και την χρήση του “Easy ID”.

8.4 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τα δείγματα του εκπνεόμενου αέρα και των δύο ομάδων των μοναχών εκφράζονται με όρους θετικής και αρνητικής κυψελιδικής κλίσης που παρουσιάστηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Για την ομάδα των εθελοντών μοναχών προσδιορίστηκαν οι ουσίες που παρουσίαζαν ποσοστό εμφάνισης στα δείγματα πάνω από 80%. Ακολούθως έγινε διάκριση των ενώσεων αυτών με βάση την αρνητική και την θετική κυψελιδική κλίση τους. Από ένα σύνολο 43 κοινών πτητικών οργανικών ουσιών, 29 εμφάνισαν θετική κυψελιδική κλίση και 14 αρνητική. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 8.1 και 8.2.

Πίνακας 8.1: VOCs στον εκπνεόμενο αέρα εθελοντών ανδρών μοναχών με αρνητική κυψελιδική κλίση

VOCs	Μέση κυψελιδική κλίση ($\times 10^{-2}$)	% Εμφάνιση
1. Ethanol	-2,22	80
2. Napthalene	-2,04	100
3. benzene1-ethenyl-4-ethyl	-0,44	100
4. Alpha-pinene	-0,42	100
5. Benzene 1,3 dimethyl	-0,37	100
6. Benzene, 1-ethyl-4-methyl	-0,35	100
7. Nonanal	-0,31	100
8. Methane, chloro	-0,30	100
9. Hexanal	-0,23	90
10. Decanal	-0,15	100
11. Styrene	-0,07	100
12. Benzene, ethyl	-0,02	100
13. Decane	-0,01	100
14. Benzene	-0,01	100

Πίνακας 8.2: VOCs στον εκπνεόμενο αέρα εθελοντών ανδρών μοναχών με θετική κυψελιδική κλίση

VOCs	Μέση κυψελιδική κλίση ($\times 10^{-2}$)	% Εμφάνιση
1. Acetone	505,96	100
2. Phenol	16,64	
3. di-Limonene	15,34	80
4. 2-pentanone	1,49	100
5. Isoprene	0,89	100
6. Acetaldehyde	0,43	80
7. n-octyl acetate	0,42	100
8. Dichloromethane	0,32	80
9. Octane	0,25	90
10. Hexane 3-methyl	0,23	90
11. Hexane 2 methyl	0,19	100
12. Heptane	0,14	80
13. 2-β pinene	0,14	100
14. Heptane 2-methyl	0,14	100
15. Heptane 4-methyl	0,14	80
16. Heptane 3-methyl	0,13	90
17. Carbonic acid, dimethyl ester	0,10	90
18. Heptane 2,4-dimethyl	0,10	100
19. Ethanone, 1-phenyl	0,10	100
20. Benzene 1,2,3-trimethyl	0,09	90
21. Cyclohexane, methyl	0,08	80
22. Cyclohexanone	0,07	100
23. Benzene, (1-methylethenyl)	0,06	90
24. Toluene	0,04	100
25. Nonane	0,04	100
26. 1-hexanol, 2 ethyl	0,04	100
27. 2-butanone	0,03	100
28. Cyclohexane, 1,4-dimethyl	0,03	90
29. Benzene, 1,2 dimethyl	0,001	100

Για την ομάδα των γυναικών μοναχών το προφίλ των ουσιών που προσδιορίστηκαν αντίστοιχα με αυτό για τους άνδρες εμφανίζεται στους πίνακες που ακολουθούν. Το σύνολο των κοινών ουσιών που προσδιορίστηκαν ήταν 52 ενώ 39 από αυτές εμφάνισαν θετική κυψελιδική κλίση και 13 αρνητική κυψελιδική κλίση. Και στην περίπτωση της δεύτερης ομάδας το χημικό προφίλ εμφανίζεται παρόμοιο με αυτό της ομάδας των ανδρών μοναχών.

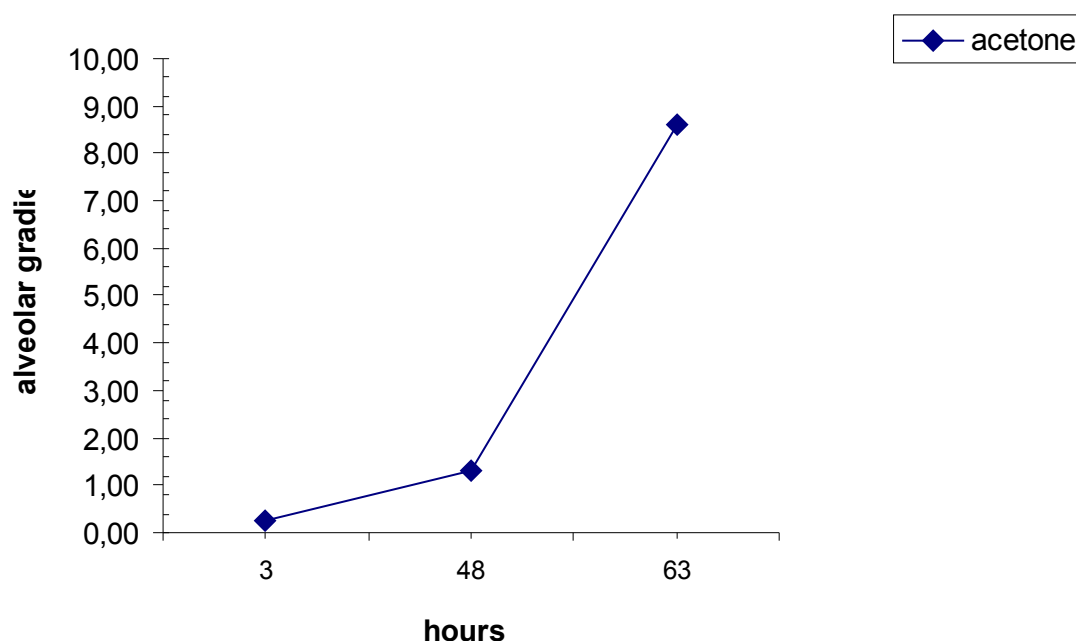
Πίνακας 8.3: VOCs που ανιχνεύθηκαν στον εκπνεόμενο αέρα γυναικών μοναχών με θετική κυψελιδική κλίση.

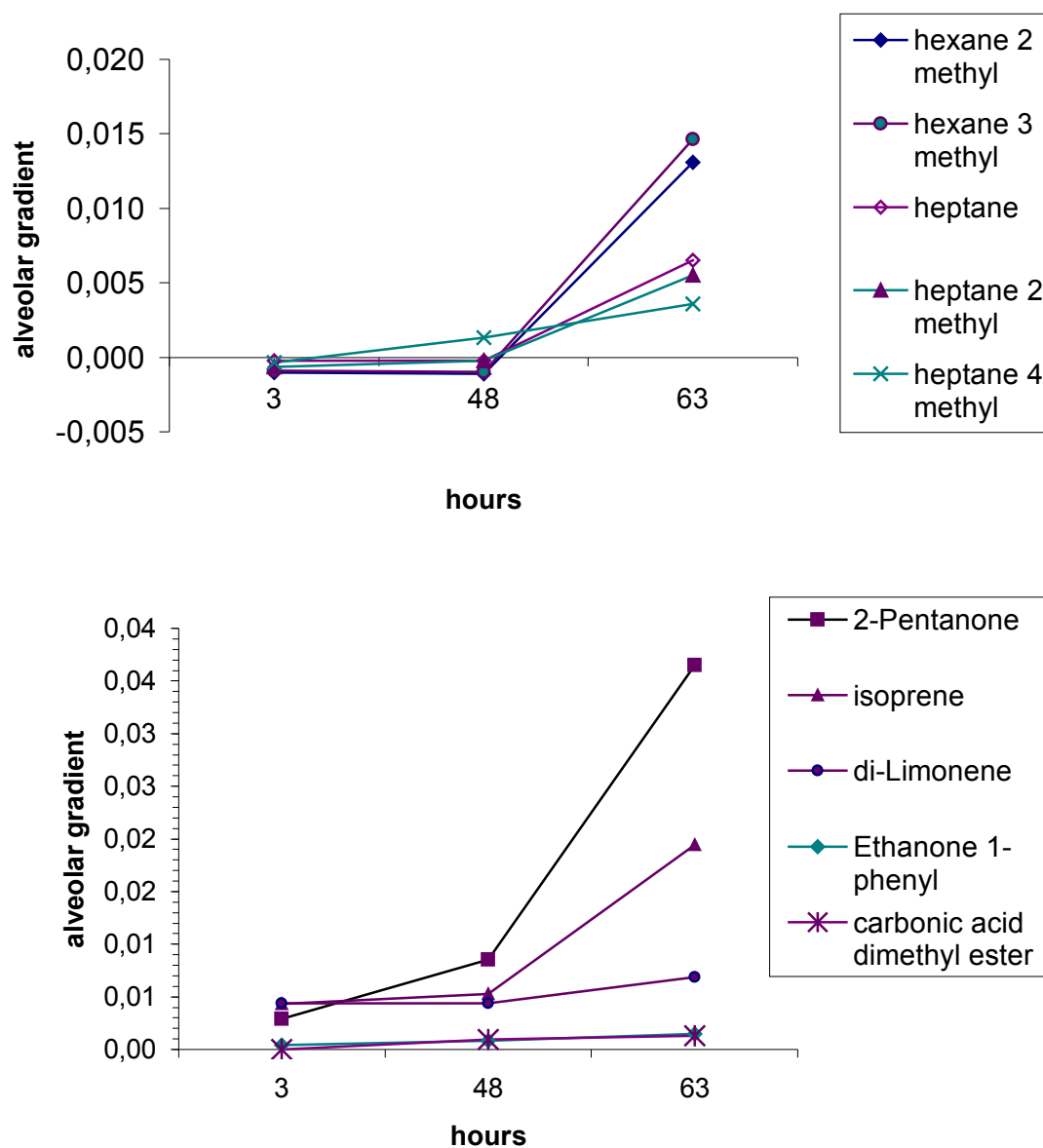
VOCs	Μέση κυψελιδική κλίση ($\times 10^{-2}$)	% Εμφάνιση
1. Acetone	675,67	100
2. Phenol	23,14	100
3. 2-Pentanone	18,92	100
4. Isoprene	10,91	100
5. di-Limonene	10,09	100
6. Acetaldehyde	0,92	100
7. Hexane, 2-methyl	0,29	100
8. Pentane	0,28	80
9. Pentane, 2-methyl	0,27	80
10. Hexane	0,27	90
11. Carbonic Acid, dimethyl ester	0,27	100
12. Pentane, 2,3-dimethyl	0,25	90
13. Hexane, 3-methyl	0,22	100
14. Benzene	0,21	90
15. 2-Beta pinene	0,20	80
16. 2-Butanone	0,20	90
17. Acetic Acid	0,19	90
18. Hexane, 2,3-dimethyl	0,16	90
19. Heptane, 2-methyl	0,15	100
20. Heptane, 3-methyl	0,15	100
21. Heptane, 4-methyl	0,14	100
22. 2-Pentanone, 4-methyl	0,14	90
23. Cyclohexane, 1,2-dimethyl	0,13	80
24. Toluene	0,12	100
25. Octane	0,11	100
26. Heptane, 4,4-dimethyl	0,09	90
27. Heptane, 2,4-dimethyl	0,09	90
28. Heptane, 2,2-dimethyl	0,09	90
29. Heptane, 2,3-dimethyl	0,08	90
30. Octane, 4-methyl	0,08	100
31. Octane, 3-methyl	0,08	100
32. Cyclohexanone	0,07	100
33. Nonane	0,07	100
34. Benzene, 1-ethyl, 3-methyl	0,06	90
35. Nonane 3 methyl	0,05	90
36. 2-hexanone	0,04	90
37. Decane 4-methyl	0,003	90
38. n-octyl acetate	0,003	90
39. 1-hexanol 2-ethyl	0,002	100

Πίνακας 8.4: VOCs που ανιχνεύθηκαν στον εκπνεόμενο αέρα γυναικών μοναχών με αρνητική κυψελιδική κλίση.

VOCs	Μέση κυψελιδική κλίση ($\times 10^{-2}$)	% Εμφάνιση
1. Benzaldehyde	-3,67	100
2. Nonanal	-3,14	100
3. Hexanal	-1,92	100
4. Styrene	-0,91	100
5. Methane trichloro	-0,79	90
6. Decanal	-0,65	100
7. Benzene 1 ethyl-3-methyl	-0,63	90
8. Naphthalene	-0,29	100
9. Benzene 1,2-dimethyl	-0,27	90
10. Benzene ethyl	-0,19	80
11. Undecane	-0,17	90
12. Octanal	-0,07	100
13. alpha pinene	-0,03	100

Για έναν από τους εθελοντές μοναχούς πραγματοποιήθηκε έλεγχος του κατά την διάρκεια της νηστείας με συλλογή δειγμάτων για 3, 48 και 63 ώρες. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν διακρίθηκαν σε εκείνα που αφορούν ενώσεις με θετική κυψελιδική κλίση και σε εκείνα με αρνητική κυψελιδική κλίση. Στα γραφήματα που ακολουθούν και για τις ενώσεις εκείνες που εμφανίστηκαν σε ποσοστό μεγαλύτερο από 80% και θετική κυψελιδική κλίση στα συνολικά δείγματα παρουσιάζεται η πορεία παραγωγής τους για τον έναν εθελοντή που εξετάστηκε.





Σχήμα 8.1: Γραφήματα για τις ενώσεις εκείνες που εμφάνισαν αυξανόμενη θετική κυμελιδική κλίση σε έναν εθελοντή μοναχό κατά την διάρκεια αυστηρής νηστείας και για χρονικά διαστήματα 3, 48 και 63 ωρών

8.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

1. Το προφίλ των πτητικών οργανικών ενώσεων τόσο για την ομάδα των ανδρών μοναχών όσο κι αυτό των γυναικών εμφανίζει μικρές διαφοροποιήσεις οι οποίες συνίστανται στην παρουσία κυρίως περισσότερων υδρογονανθράκων (διακλαδισμένων).
2. Για τις δύο ομάδες οι κυρίαρχες ενώσεις που χαρακτηρίζονται ως ενδογενής (θετική κυψελιδική κλίση) εμφανίζονται να είναι η ακετόνη, η φαινόλη, η 2-πεντανόνη, το ισοπρένιο, η ακεταλδεΐδη, το d-λεμονένιο.
3. Η ακετόνη εμφανίζει σημαντική διαφοροποίηση στην τιμή της κυψελιδικής κλίσης σε σχέση με τις υπόλοιπες ουσίες που την καθιστά ικανή για την εφαρμογή της σαν marker της ανθρώπινης παρουσίας σε συσκευές εντοπισμού εγκλωβισμένων. Η φαινόλη, η 2-πεντανόνη και το ισοπρένιο στην περίπτωση της ομάδας των γυναικών μοναχών είναι ουσίες υποψήφιες για την εφαρμογή τους αντίστοιχα με την ακετόνη. Για την περίπτωση της ομάδας των ανδρών μοναχών κάτι τέτοιο ισχύει για την φαινόλη και το d-λεμονένιο.
4. Οι διαφοροποίηση που εμφανίζεται μεταξύ των δύο ομάδων για τις ενώσεις με θετική κυψελιδική κλίση οφείλεται κυρίως στον λίγο μεγαλύτερο χρόνο δειγματοληψίας του εκπνεόμενου αέρα των μοναχών γυναικών έναντι αυτού των ανδρών (70 ώρες/63ώρες) και στο μεγαλύτερο δείγμα εθελοντών (7 άνδρες /15 γυναίκες)
5. Στο χημικό προφίλ και των δύο ομάδων εμφανίζεται ένα μεγαλύτερο ποσοστό σε ενώσεις οξυγονούχες (κυρίως κετόνες) και μεγαλύτερη ποικιλία σε υδρογονάνθρακες σε σύγκριση με τις ουσίες που εμφανίζονται στην ομάδα αναφοράς.
6. Η μεγάλη τιμή της κυψελιδικής κλίσης που εμφανίζεται για την ακετόνη σχετίζεται με την παρουσία του φαινομένου της κέτωσης στον ανθρώπινο οργανισμό. Κατά την διαδικασία αυτή η οποία εμφανίζεται σε καταστάσεις παρατεταμένης νηστείας, λόγω της έλλειψης των απαιτούμενων επιπέδων σε γλυκόζη παρατηρείται παραγωγή κετονοσωμάτων (ακετόνη, υδροξυβουτυρικό και ακετοξικό οξύ). Τα κετονοσώματα χρησιμοποιούνται σαν εναλλακτικές πηγές ενέργειας της γλυκόζης.
7. Η 2-πεντανόνη φαίνεται να ακολουθεί την ίδια συμπεριφορά με την ακετόνη που φαίνεται να προέρχεται ενδεχομένως από την ίδια μεταβολική πορεία.
8. Θα πρέπει να σημειωθεί πως ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει η φαινόλη η οποία εμφανίζει αυξημένες τιμές για την περίπτωση των ομάδων υπο αυστηρή νηστεία και δεδομένου πως εμφανίζεται ταυτόχρονα στο αίμα αλλά και στα ούρα, όπως προέκυψε από τις μετρήσεις για την ομάδα αναφοράς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής και σε συνεργασία με ερευνητικές ιατρικές ομάδες (Ψυχοφυσιολογικό Εργαστήριο, τμήμα Ψυχιατρικής, Αιγινίτιου Νοσοκομείου, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, τμήμα Εγκληματολογίας και Τοξικολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, τμήμα Νοσηλευτικής, ΤΕΙ Ηπείρου) αναπτύχθηκε μια “θεωρία εγκλωβισμού” εκφρασμένη με όρους νευροενδοκρινικών, σωματικών και μεταβολικών αντιδράσεων και προσαρμοσμένη στις διαφορετικές καταστάσεις εγκλωβισμού που προκύπτουν με την κατάρρευση κτηρίων μετά από σεισμό.

Οι καταστάσεις αυτές περιγράφονται για πριν και μετά τις 24 ώρες, με πειραματικό όριο (για τις σειρές μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν) τις 70 ώρες (3 μέρες). Το όριο αυτό, αποτελεί για τα σημερινά δεδομένα το χρονικό εύρος για την αποτελεσματικότητα της διεξαγωγής των επιχειρήσεων εντοπισμού και διάσωσης. Οι διαφορετικές καταστάσεις εγκλωβισμού και η ταξινόμηση τους σε συνδυασμό με τις μεταβολικές αντιδράσεις περιγράφονται στον πίνακα 9.1 που ακολουθεί:

Πίνακας 9.1: Καταστάσεις εγκλωβισμού κατηγοριοποιημένες ανάλογα με τις μεταβολικές αντιδράσεις, σε αντιστοιχία με τον χρόνο εγκλωβισμού και την σοβαρότητα των τραυματισμών

Είδη Εγκλωβισμού	Α Τύπος Α		Β Τύπος Β		Γ Τύπος Γ
	Τύπος Α ₁	Τύπος Α ₂	Τύπος Β ₁	Τύπος Β ₂	
Κατάσταση Υγείας	Έντονο στρες Χωρίς ή με λίγους τραυματισμούς	Έντονο στρες Χωρίς ή με λίγους τραυματισμούς	Τραυματισμοί Έντονο στρες	Τραυματισμοί Έντονο στρες Αρχικό στάδιο σήψης	Θάνατος Σήψη
Διάρκεια Εγκλωβισμού	<i>< 24 ώρες</i>	<i>24 ώρες<</i>	<i>< 24 ώρες</i>	<i>24 ώρες <</i>	
Πιθανές Μεταβολικές Αντιδράσεις	i) Αύξηση ελεύθερων λιπαρών οξέων ii) Μικρή αύξηση στα επίπεδα της γλυκόζης	i) Αύξηση ελεύθερων λιπαρών οξέων ii) Υπεργλυκαιμία iii) Αύξηση στο αίμα του γαλακτικού οξέος iv) Υπερκαλιαιμία Υπονατραιμία	i) Λιπόλυση ii) Υπεργλυκαιμία iii) Διάσπαση Τριακυλογλυκερολών iv) Απελευθέρωση ιστικών παραγόντων v) Πρωτεόλυση	i) Αύξηση ελεύθερων λιπαρών οξέων ii) Υπεργλυκαιμία iii) Αύξηση της γλυκερόλης iv) Υπερκαλιαιμία Υπονατραιμία v) Πρωτεόλυση	i) Παραγωγή ελεύθερών λιπαρών οξέων ii) Αποικοδόμηση ζώσας ύλης iii) Γλυκόλυση iv) Υπερκαλιαιμία v) Πρωτεόλυση
Εκκρίσεις που ενδιαφέρουν	Ούρα Ιδρώτας Εκπν. Αέρας	Εκπν. Αέρας Ούρα Ιδρώτας	Εκπν. Αέρας Αίμα Ούρα, Ιδρώτας	Εκπν. Αέρας Αίμα Ούρα	Αίμα Ούρα

Για τις ανάγκες της παρούσας διδακτορικής διατριβής προσομοιώθηκαν οι διαφορετικές καταστάσεις εγκλωβισμού που προκύπτουν μετά από σεισμό για την πειραματική προσέγγιση του προβλήματος ως ακολούθως:

Ομάδα “φυσιολογικών” εθελοντών, με βιοχημικούς δείκτες εντός των φυσιολογικών ορίων. Η ομάδα αυτή χαρακτηρίζεται σαν ομάδα αναφοράς. Ενώ η ποιοτική και ποσοτική χημική πληροφορία που προκύπτει από τις αναλύσεις των τριών εκκρίσεων, λειτουργεί σαν μέσο σύγκρισης και διαφοροποίησης, για την κάθε ομάδα εθελοντών που προσεγγίζεται.

Επιπλέον, η ομάδα των εθελοντών με έντονο στρες θεωρείται και εξετάστηκε σαν αντιπροσωπευτική της κατάστασης εγκλωβισμού τύπου A₁. Ενώ οι ομάδες εθελοντών σε αυστηρή νήστεια (με αποχή από νερό και φαγητό για χρονικό διάστημα 3 ημερών) αντιπροσωπεύουν την κατάσταση εγκλωβισμού τύπου A₂.

Για την κάθε κατάσταση προέκυψαν τα εξής:

Πίνακας 9.2: Τύποι εγκλωβισμού που μελετήθηκαν πειραματικά και συμπερασματικά ενώσεις που προσδιορίζονται με μεγαλύτερη αφθονία στον εκπνεόμενο αέρα.

Είδη Εγκλωβισμού	Εκπνεόμενος Αέρας	Κυρίαρχες Ενώσεις
Τυπος A₁	Υδρογονάνθρακες Αλκοόλες Αλδεύδες Κετόνες Αρωματικές Τερπένια	Ακετόνη Ισοπρένιο Αιθανόλη
Τύπος A₂	Κετόνες Υδρογονάνθρακες Αλκοόλες Αλδεύδες Αρωματικές Τερπένια	Ακετόνη 2-πεντανόνη Φαινόλη Λεμονένιο Ισοπρένιο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Οι σειρές πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν αποτελούν ένα μέρος των καταστάσεων εγκλωβισμού όπως ορίστηκαν στο κεφάλαιο 4.

Η μελέτη, με χρήση προσομοιούμενων ομάδων, της κατάστασης εγκλωβισμού τύπου B παραμένει ένα κομμάτι προς διερεύνηση. Γίνεται σαφές πως η μελέτη αυτή εμφανίζει ιδιαιτερότητες κυρίως λόγω θεμάτων ηθικής και αυξημένης επικινδυνότητας του δείγματος των εθελοντών (π.χ. άτομα στην εντατική, πολυτραυματίες κ.α). Η χρήση φαρμάκων, που εφαρμόζονται σε αυτές τις περιπτώσεις, είναι μια σημαντική παράμετρος που πρέπει να ληφθεί υπόψη κυρίως για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Ο τρόπος δειγματοληψίας αποτελεί επίσης μια παράμετρο δυσκολίας για την συλλογή των δειγμάτων του εκπνεόμενου αέρα (μεσολάβηση διασωλήνωσης του ασθενή). Η δημιουργία πρωτοκόλλων δειγματοληψίας, για ομάδες εθελοντών που προσομοιάζουν την κατάσταση εγκλωβισμού τύπου B, σε συνεργασία με ιατρική ομάδα είναι απαραίτητη.

Οι πτητικές οργανικές ενώσεις που προέκυψαν στον εκπνεόμενο αέρα των ομάδων που χρησιμοποιήθηκαν για την προσομοίωση της κατάστασης εγκλωβισμού τύπου A, απαιτούν την επιβεβαίωση από μεγαλύτερα δείγματα εθελοντών στοχευμένα πλέον στις κατηγορίες των ενώσεων που προέκυψαν από τις μετρήσεις της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Η προσέγγιση αυτή εξακολουθεί να είναι ιδιαίτερα δύσκολη στο κομμάτι της εύρεσης των ομάδων καθώς και της συλλογής και επεξεργασίας των μετρήσεων.

Η μελέτη των πτητικών οργανικών ενώσεων που υπάρχουν στο αίμα και τα ούρα είναι ακόμα ένα κομμάτι για την συμπλήρωση των ουσιών που πρέπει να εξεταστούν στις ομάδες που προσομοιάζουν τους τύπους εγκλωβισμού τύπου A και B.

Η αυτοματοποίηση ή η χρήση μιας οργανολογίας που θα παρακάμπτει το στάδιο της συλλογής και μεταφοράς του δείγματος σε σωλήνα που περιέχει το προσροφητικό υλικό συλλογής των VOCs με μια μέθοδο που να έχει την δυνατότητα μέτρησης σε χαμηλά όρια ανίχνευσης ουσιών όπως η νέες αναπτυσσόμενες τεχνολογίες των SIFT-MS και PTR-MS για την μελέτη των ουσιών σε μεγαλύτερα δείγματα εθελοντών είναι επίσης μια παράμετρος που θα βοηθήσει στην σαφέστερη εικόνα του θέματος των VOCs στον εκπνεόμενο αέρα.

Ο συνδυασμός της ογκώδους χημικής πληροφορίας που προκύπτει από την οργανολογία μέτρησης και το πλήθος των ουσιών με χημειομετρικά εργαλεία για την γρήγορη στατιστική επεξεργασία και εξαγωγής αποτελεσμάτων είναι μέσα στις άμεσες προοπτικές την διδακτορικής διατριβής καθώς και στα πλαίσια της ευρύτερης έρευνας που πραγματοποιείται στον χώρο της μεταβολομικής.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

VOCs	Volatile Organic Compounds
EPA	Environmental Protection Agency, USA
NIST	National Institute of Standards and Technology
HMDB	Human Metabolome Database
PCA	Principal Component Analysis
BCA	Hierarchical Cluster Analysis
pptv	Parts per trillion by volume
ppbv	Parts per billion by volume
FSL	Fused Silica Lined
PVF	Poly Vinyl Fluoride (Tedlar)
SPME	Solid Phase Micro Extraction
TDU	Thermal Desorption Unit
GC/MS	Gas Chromatography/Mass Spectrometry
BTV	BreakThrough Volume
FID	Flame Ionization Detector
IMS	Ion Mobility Spectrometry
PTR-MS	Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry
SIFT-MS	Selected Ion Flow Tube-Mass Spectrometry
QCM	Quartz Crystal MicroBallance
PRL	Prolactine
GH	Growth Hormone
ACTH	AdrenoCorticoTrophin
ADH	AntiDiuretic Hormone
MSD	Maas Spectrometry Detector

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alberti G., (2001) Noncommunicable diseases: tomorrow's pandemics *Bull. World Health Organ.* 79: 907
- Alexander D., (1993) "Natural Disasters", UCL Press p:461-492
- Applied Technology Council (1999) Earthquake Aftershocks-Entering Damaged Buildings. *ATC Techbrief 2*, Available at <http://www.atccouncil.org>
- Atali C.B., (1987) Hormonal responses to dreaded surgical stress, *Arch. Intern. Med.*, 147
- Barbera J and M. Lozano (1993) Urban Search and Rescue Medical Teams: FEMA Task Force System. *Pre-hospital and Disaster Medicine* 8 (4): 349-355
- Beauchamp J., Herbig J., Gutmann R., Hansel A., (2008) On the use of Tedlar® bags for breath-gas sampling and analysis. *Journal of Breath Research.* 2:1-19
- Beckmann U. (1991) Listening devices in heavy search and rescue. *Fire Engineering* 144: 87-90
- Borgerding AJ, Wilkerson CW, (1996) A comparison of cryofocusing injectors for gas sampling and analysis in fast GC *Anal. Chem.* 68 (17):2874-2878.
- Cailleux A., Moreau X., Delhumeau A., Allain P. (1993) Decrease of isoprene concentrations in blood during general anesthesia *Biochem. Med. Metab. Biol.* 49 (3):321-5.
- Carlson P., Doeneche D., Koolman J., Βιοχημεία Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας 14^η Έκδοση Αθήνα σελ 431-489
- Cerra B. F., "The syndrome of hypermetabolism and multiple system organ failure", *Surgery* 56, 656-666
- Cerra B.F., (1987) "Hypermetabolism, organ failure, and metabolic support", *Surgery* 101 (1)
- Chiu W., J. Arnold, Y. Shih et al. (2002) A Survey of International Urban Search-and-rescue Teams following the Ji Ji Earthquake. *Disasters* 26 (1): 85-94
- Cuthbertson, DP. (1932) Observations on the disturbance of metabolism produced by injury to the limbs. *Q. Journal of Medicine* 1: 233-246
- Dannecker J.R., Shaskan E.G., Phillips M., (1981) A new highly sensitive assay for breath acetaldehyde: detection of endogenous levels in humans. *Analytical Biochemistry* 114:1-7
- Daviss E., (2005) Growing pains for metabolomics *The Scientist* 19 (8): 25-28
- Deng C., Li N., Zhang X., (2004) Development of a headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for determination of hexanal and heptanal in human blood *Journal of Chromatography B* 813:47-52
- Deng C., Zhang J., Yu X., Zhang W., Zhang X., (2004) Determination of acetone in human breath by gas chromatography-mass spectrometry and solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *Journal of Chromatography B.* 810:269-275
- Dettmer K., Hammock B.D., (2004) Metabolomics-A new exciting field within the "omics" sciences. *Environ. Health Perspect* 112, A396-397

- Eisenreich W., Bacher A., Arigoni D., Rohdich F., (2004) Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 (12): 1401-1426
- EPA (1988) Compendium method TO-14: The determination of volatile organic compounds (VOCs) in ambient air using summa passivated canister sampling and gas chromatographic analysis.
- EPA (1999a) Compendium method TO-14A: Determination of volatile organic compounds (VOCs) in ambient air using specially prepared canisters with subsequent analysis by gas chromatography.
- EPA (1999b) Compendium method TO-15: Determination of volatile organic compounds (VOCs) in ambient air using specially prepared canisters with subsequent analysis by gas chromatography
- Fiehn O., (2002) Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 48, 155-171
- Frayn K.N., (1986) Hormonal control of metabolism in trauma and sepsis *Clinical Endocrinology* 24:577-599
- Fustinoni, S., Giampiccolo R., Pulvirenti S., Buratti M., Colombi A., (1999) Headspace solid-phase microextraction for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in urine. *J. Chrom. B* 723(1-2):105-115
- Giardina M., Olesik V.S., (2003) Application of low-temperature glassy carbon-coated microfibers for solid-phase microextraction analysis of simulated breath volatiles. *Analytical Chemistry* 75:1604-1614
- Grote C., Pawliszyn J., (1997) Solid-phase microextraction for the analysis of human breath *Analytical Chemistry* 69:587-596
- Guidotti M. Onorati B., Lucarelli E., Blasi G., Ravaioli G., (2001) Determination of chlorinated solvents in exhaled air, urine and blood of subjects exposed in the workplace using SPME and GC-MS. *American Clinical Laboratory* 23-26
- Gyuton A. “Φυσιολογία του ανθρώπου”, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 3^η έκδοση Αθήνα 1990, σελ 348.
- Handelman G.J., Rosales L.M., Barbato D., Lucher J., Adhikarla R., Nicolosi R.J., Finkelstein F.O., Ronco C., Kaysen G.A., Hoenich N.A., Levin N.W., (2003) Breath ethane in dialysis patients and control subjects. *Free Radical Biology and Medicine* 1 (35): 17-23
- Harvey R.A., Champe P.C., Φαρμακολογία, Επιστημονικές Εκδόσεις Γρ. Παρισιάνος 5^η έκδοση, Αθήνα σελ. 122
- Hederson M.J., Karger B.A., Wrenshall G.A., (1952) Acetone in the breath-A study of acetone exhalation in diabetic and nondiabetic human subjects. *Diabetes* 1 (3):188-193
- Huang H.H., Zhou J., Chen Y.S., Zeng L., Huang Y.P., (2004) A highly sensitive QCM sensor coated with Ag⁺-ZSM-5 film for medical diagnosis. *Sensors and Actuators B* 101 (3):316-321
- Hyspler R., Chrova S., Gasparic J., Zadak Z., Cizkova M., Balasova V., (2000) Determination of isoprene in human expired breath using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry *Journal of Chromatography B.* 739 (1):183-190

- Inoue-Sakurai C., Maruyama S., Morimoto K., (2000) Posttraumatic stress and lifestyles are associated with natural killer cell activities in victims of the Hanshin-Awaji earthquake in Japan. *Preventive Medicine* 31:467-473
- Iskit H.S, Alpaya H., (2001) Analysis of 33 pediatric trauma victims in the 1999 Marmara, Turkey earthquake *Journal of Pediatric Surgery* 36 (2):368-372
- Jones A.W., (1985) Electrochemical measurement of breath-alcohol concentration: precision and accuracy in relation to blood levels *Clin. Chim. Acta*, 146 (2-3): 175-83.
- Jones P. (1997) Urban Search and Rescue Training in Australia. *Fire Engineers Journal* 57 (189): 11-13
- Jones, A.W., (1985) Excretion of low-molecular weight volatiles in human breath, focus on endogenous ethanol. *J. of Anal. Toxicol.* 9:246-250.
- Jones A.W., Lagesson V., Tagesson C., (1995) Determination of isoprene in human breath by thermal desorption gas chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B.* 672:1-6
- Junting, L., Peng C., Suzuki O, (1998) Solid-phase microextraction (SPME) of drugs and poisons from biological samples *Forensic Sci. Int.* 97 93.
- Kalayjian, A.S., (1995) Disaster and Mass Trauma, Global Perspectives on Post Disaster Mental Health Management. *Vista Publishing.*
- Karl T., Prazeller P., Mayr D., Jordan A., Rieber J., Fall R., Lindiger W., (2001) Human breath isoprene and its relation to blood cholesterol levels: New measurements and modeling. *Journal of Applied Physiology* 91 (2):762-770
- Kneepkens M.E.C., Lepage G., Roy C.C., (1994) The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine* 17:127-160
- Knutson M.D., Viteri F.E., (1996) Concentrating breath samples using liquid nitrogen: a reliable method for the simultaneous determination of ethane and pentane, *Analytical Biochemistry* 242:129-135
- Kowalski K.M., Vaught, C., (1999) Issues Regarding the Safety and Health of Emergency Workers. The International Emergency Management Conference, TIEMS 1999. University of Delft, The Netherlands.
- Kowalski K.M. and A. Kalayjian (2001) Responding to mass emotional trauma: a mental health outreach program for Turkey earthquake victims. *Safety Science* 39: 71-81
- Krotoszynski B., Gabriel G., O' Neil H., (1977) Characterization of human expired air: a promising investigative and diagnostic technique *J. of Chromatogr. Sci.* 15 (7):239-44.
- Kundu S.K., Bruzek J.A., Nair R., Judillay A.M, (1993) Breath acetone analyzer: diagnostic tool to monitor dietary fat loss *Clin. Chem.*, 39:87-92.
- Kuwagata Y., Oda J., Tanaka H., Iwai A., Matsuoka T., Takaoka M., et al, (1997). Analysis of 2702 traumatized patients in the 1995 Hanshin-Awaji earthquake. *Journal Trauma* 43: 427-432.
- Lord H. Yu Y.F., Segal A., Pawliszyn J., (2002) Breath analysis and monitoring by membrane extraction with sorbent interface. *Analytical Chemistry* 74 (21):5650-5657.

- Manolis A., McBurney L. J., Bobbie B.A., (1983) The detection of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in the breath of human subjects *Clin. Biochem.* 16:229.
- McClenny W.A., Pleil J.D., Evans G.F., Oliver K.D., Holdren M.W., Winberry W.T., (1991) Canister-based method for monitoring toxic VOCs in ambient air. *Journal of Air and Waste Management Association.* 41 (10):1308-18
- McGarvey L. J., Shorten C.V., (2000) The effect of adsorption on the reusability of Tedlar® air sampling bags *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 61 375-380
- McGrath T.L., Patrick R., Slike B., (2001) Breath isoprene in patients with heart failure. *The European Journal of Hearth Failure* 3:423-427
- Mendis S, Sobotka P.A., Euler D.E., (1994) Pentane and isoprene in expired air from human: gas chromatographic analysis of a single breath. *Clinical Chemistry* 40:1485-1488
- Miekisch W., Schubert J.K., Noeldge-Schomburg G.F.E., (2004) Diagnostic potential of breath analysis –focus on volatile organic compounds. *Clinica Chimica Acta* 347: 25-39
- Mills F.J., Chir, B., Med, D.A., (1985). The endocrinology of stress. *Aviation Space and Environment Medicine* 56, 642-650
- Mills G.A., Walker V., Mughal H., (1999) Quantitative determination of trimethylamine in urine by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry *J. Chrom. B*, 723 (1-2):281-285.
- Mills G.A., Walker V., (2000) Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials *Journal of Chromatography A* 902, 267-287
- Mills G.A., Walker V., (2001a) Headspace solid-phase microextraction profiling of volatile organic compounds in urine: Application to metabolic investigations *Journal of Chromatography B Biomed Sci Appl* 753: 259-268
- Mills G.A., Walker V., (2001b) Headspace solid-phase microextraction profiling of volatile compounds in urine: application to metabolic investigations, *Journal of Chromatography B*, 753 (2):359-268
- Montuschi P., Nightingale J.A., Kharitonov S.A., Barnes P.J., (2002) Ozone-induced increase in exhaled 8-isoprostane in healthy subjects is resistant to inhaled budesonide. *Free Radical Biology and Medicine* 33 (10): 1403-1408
- Mueller W., Schubert J., Benzing A., Geiger K., (1998) Method for the analysis of exhaled air by microwave energy desorption coupled with gas chromatography-flame ionization detection-mass spectrometry *Journal of Chromatography B* 716 (1-2):27-38
- Murphy R., Blitch J., Casper J., (2002) AAI/RoboCup-2001 Urban Search and Rescue Events Reality and Competition. *American Association for Artificial Intelligence* 23 (1): 37-42
- Murphy R.R., J. Casper, M. Micire (2001) Potential Tasks and Research Issues for Mobile Robots in Robocup Rescue. *Computer Science and Engineering*: 339-344
- Murphy R.R. Casper J., Micire M., (2000) Potential Tasks and Research Issues for Mobile Robots in RoboCup Rescue. P. Stone, T.Balch, and G. Kraetzschmar (Eds.):RoboCup, LNAI 2019:339-344

- Murtz M., Thelen S., Fritsch T., Hering P., (2007) Laser spectroscopic online monitoring of volatile diseasemarkers in human breath. *Advances in Medical Engineering* 114:441-446.
- Nakamori Y., Tanaka H., Oda J., Kuwata Y., Matsuoka T., Yoshioka, T., (1997). Burn injuries in the 1995 Hanshin-Awaji earthquake. *Burns* 23 (4):319-322
- Natale D.C., Macagnano A., Martinelli E., Paolesse R., D'Arcangelo G., Roscioni C., Finazzi-Agro A., D'Amico A., (2003) Lung cancer identification by the analysis by breath by means of an array of nonselective gas sensors. *Biosensors and Bioelectronics* 18 (10):1209-1218
- Ochiai N., Takino M., Daishima S., Cardin D., (2001) Analysis of volatile sulphur compounds i breath by gas chromatography-mass spectrometry using three-stage cryogenic trapping preconcentration system. *Journal of Chromatography B.* 762:67-75
- Ochiai N., Tsuji A., Nakamura N., Daishima S., Cardin D.B., (2002) Stabilities of 58 volatile organic compounds in fused-silica-lined and SUMMA polished canisters under various humidified conditions. *Journal of Environmental Monitoring* 4:879-89
- Oliver K.D., Pleil J.D., McClenny W.A., (1986) Sample integrity of trace level volatile organic compounds in ambient air stored in SUMMA polished canisters. *Atmospheric Environment* 20 (7):1403-11
- Oliver S.G., Winson M.K., Kell D.B., Baganz F., (1998) Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology* 16: 373-378
- Olson R.S. and R.A. Olson (1987) Urban Heavy Rescue. *Earthquake Spectra* 3 (4): 645-658
- Ozdogan S., Hocaoglu A., Caglayan B., Imamoglu OU., Aydin D., (2001). Thorax and lung injuries arising from the two earthquakes in Turkey in 1999. *Chest* 120: 1163-1166
- Papadopoulos I.N., Kanakaris N., Triantafillidis A., Stefanakos J., Kainourgios A., Leukidis C., (2004) Autopsy findings from 111 deaths in the 1999 Athens earthquake as a basis for auditing the emergency response. *British Journal of Surgery* 91:1633-1640.
- Phillips M., Greenberg J., (1987) Detection of endogenous acetone in normal human breath J. Chrom. 422:235-8.
- Phillips M., Sabas M., Greenberg J., (1993) Increased pentane and carbon disulfide in the breath of patients with schizophrenia Am. J. Clin. Pathol. 46:861-864.
- Phillips M., (1997) Method for the collection and assay of volatile organic compounds in breath *Analytical Biochemistry* 247: 272-278
- Phillips M., Glesson K., Hughes J.M.B., Greenberg J., Cataneo R.N., Baker L., McVay W.P., (1999a) Volatile organic compounds in breath as marker of lung cancer: a cross sectional study. *Lancet* 353: 1930-1933
- Phillips M., Herrera J., Krishman S., Zain M., Greenberg J., Cataneo R.N., (1999b) Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. *Journal of Chromatography B* 729 (1-2): 75-88
- Pleil D.J., Lindstrom A.B., (1995) Measurement of volatile organic compounds in exhaled breath as collected in electropolished canisters. *Journal of Chromatography B.* 665:271-279

- Pleil D.J., Lindstrom A.B., (1997) Exhaled human breath measurement method for assessing exposure to halogenated volatile organic compounds. *Clinical Chemistry* 43 (5):723-730
- Risby T.H., (2002) Volatile organic compounds as markers in normal and diseased states NATO Science Series, Sub Series I: *Life and Behavioural Sciences* 346: 113-122
- Roller C., Namjou K., Jeffers J., Potter W., McCann J.P., Greco J., (2002) Simultaneous NO and CO₂ measurement in human breath with a single IV-VI mid infrared laser. *Optics Letters* 27 (2):107-109
- Sanchez M.J., Sacks D.R., (2006) Development of a multibed sorption trap comprehensive two-dimensional gas chromatography, and time-of-flight mass spectrometry system for the analysis of volatile organic compounds in human breath. *Analytical Chemistry* 78:3046-3054
- Sanchez M.J., Sacks D.R., (2003) GC analysis of human breath with a series-coupled column ensemble and multibed sorption trap. *Analytical Chemistry* 75:2231-2236
- Sexton K., Adgate L.J., Fredrickson L.A., Ryan D.A., Needham L.L., Ashley L.D., (2006) Using biological markers in blood to assess exposure to multiple environmental chemicals for inner-city children 3-6 years of age. *Environmental Health Perspectives* 114 (3):453-459
- Sin D.W.M., Wong Y.C., Sham W-C., Wang D., (2001) Development of an analytical technique and stability evaluation of 143 C₃-C₁₂ volatile organic compounds in SUMMA canisters by gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst* 126:310-321
- Skeldon D.K., Patterson C., Wyse A.C., Gibson M.G., Padgett J.M., Longbottom C., McMillan C.L., (2005) The potential offered by real-time, high sensitivity monitoring of ethane in breath and some pilot studies using optical spectroscopy. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics* 7 (6):S376-S384
- Smith D., Tianshu W., Spanel P., (2002) On-line simultaneous quantification of ethanol, some metabolites and water vapour in breath following the ingestion of alcohol. *Physiological Measurement* 23 (3):477-489
- Stalnikowicz R., Tsafrir A., (2002). Acute psychosocial stress and cardiovascular events. *American Journal of Emergency Medicine* 20 (5): 488-491.
- Statheropoulos M., Mikedi A., Agapiou A., Georgiadou A., Karma S., (2006) Discriminant analysis of volatile organic compounds data related to a new location method of entrapped people in collapsed buildings of an earthquake *Analytica Chimica Acta* 566:207-216**
- Statheropoulos M., Agapiou A., Georgiadou A., (2006) Analysis of expired air of fasting male monks at Mount Athos *Journal of Chromatography B* 832:274-279**
- Statheropoulos M., Sianos E., Agapiou A., Georgiadou A., Pappa A., Tzamtzis N., Giotaki H., Papageorgiou C., Kolostoumbis D., (2005) Preliminary investigation of using volatile organic compounds from human expired air, blood and urine for locating entrapped people in earthquakes *Journal of Chromatography B* 822:112-117**
- Stegns M. M. L., Cristescu S.M., Munnik P., Zanen P., Harren F. J. M., (2007a) An off-line breath sampling and analysis method suitable for large screening studies. *Physiological Measurement* 28:503-514

- Steehns M. M. L., Cristesu S.M., Harren F. J. M., (2007b) The suitability of tedlar bags for breath sampling In medical diagnostic research, *Physiological Measurement* 28: 73-84
- Stone B.G., Besse T.J., Duane W.C., Evans C.D., DeMaster E.G., (1993) Effects of regulating cholesterol biosynthesis on breath isoprene excretion in men. *Lipids* 28 (8): 705-708.
- Sulyok M., Haberhauer-Troyer C., Rosenberg E., Gresserauer M., (2001) Investigation of storage stability of selected volatile sulfur compounds in different sampling containers *Journal of Chromatography A*. 917:367-74
- Supelco, (1998) Solid phase microextraction of volatile compounds. Application Note N.11.
- Talwar S.K., Xu S., Hawley E.S., Weiss S.A., Moxon K.A., Chapin J.L., (2002) Rat navigation guided by remote control. *Nature* 2 417 (6884): 37-8
- Tanaka H., Oda J., Iwai A., Kuwagata Y., Matsuoka T., Takaoka M., Kishi M., Morimoto F., Ishikawa K., Mizushima Y., Nakata Y., Yamamura H., Hiraide A., Shimazu T., Yoshioka T., (1999) Morbidity and mortality of hospitalized patients after the 1995 Hanshin-Awaji earthquake. *American Journal of Emergency Medicine* 17 (2):186-191
- Tangerman A., Meuwerearends M.T., Vantongeren J.H.M., (1985) New method for the release of volatile sulfur compounds from human serum its determination by Tenax trapping and gas chromatography and its application in liver diseases *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 106 (2):175-182
- Teshima N., Li Z.J., Toda K., Dasgupta K.P., (2005) Determination of acetone in breath *Analytical Chimica Acta* 535 (1-2):189-199
- Turner C., Spanel P., Smith D., (2006) A longitudinal study of breath isoprene in healthy volunteers using selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS). *Physiological Measurement* 27:13-22
- Wang J.C., Scherrer T.S., Hossain D., (2004) Measurements of cavity ringdown spectroscopy of acetone in the ultraviolet and near-infrared spectral regions: Potential for the development of a breath analyzer. *Applied Spectroscopy* 58 (7):784-791
- Wahl G. H., Hoffman A., Luft D., Liebich H.M., (1999) Analysis of volatile organic compounds in human urine by headspace gas chromatography-mass spectrometry with a multipurpose sampler. *Journal of Chromatography A*, 847 (1-2): 117-125
- Weckwerth W., (2003) Metabolomics in systems biology. *Annu Rev Plant Biol* 54:669-689
- West B. John (1996) Φυσιολογία της αναπνοής Επιστημονικές Εκδόσεις Γρ. Παρισιάνος 5^η έκδοση σελ. 17, 144
- West B. John (1993) Παθοφυσιολογία των νοσημάτων του πνεύμονα Επιστημονικές Γρ. Παρισιάνος 4^η έκδοση σελ. 144
- Wilson F.P., Freeman G.C., McEwan J.M., Milligan B.D., Allardyce A.R., Shaw M.G., (2001) Alcohol in breath and blood: a selected ion flow tube mass spectrometric study. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15:413-417
- www.usgs.gov
- Zlatkis, A., R.S. Brazell, C.F. Poole, (1981) The role of organic volatile profiles in clinical diagnosis *Clin. Chem.* 27:789-797.

Δημόπουλου Κ.Α., Ουρολογία, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 5^η έκδοση, Αθήνα, σελ. 31-33

Κουτσελίνης Α., (1991) Θέματα Ιατροδικαστικής, Αθήνα

Λέκκας Λ.Ε., (1995) “ Φυσικές & Τεχνολογικές Καταστροφές ”, Β’ Έκδοση Αθήνα, σελ.261-264

Σέχα Ν.Μ., (1988) Καταπληξία (Shock) Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας

Τσουκάτος Δ., Τσελέπης Α., Κλινική Χημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Ιωαννίνων

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΙΑΤΡΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

- Επιλογή / προετοιμασία υποκειμένων
1. Πριν από την συλλογή των δειγμάτων του εκπνεόμενου αέρα οι συμμετέχοντες (εθελοντές) απέχουν από οποιαδήποτε ιατρική αγωγή (φάρμακα, αλοιφές, επαλείψεις) για 14 ημέρες καθώς και κατά την 48ωρη διάρκεια της λήψης των δειγμάτων.
 2. Επτά (7) ημέρες νωρίτερα και κατά την διάρκεια της 48ωρης συλλογής οι συμμετέχοντες δεν πρέπει να εκτεθούν παρατεταμένα σε περιβάλλον με έντονες μυρωδιές, από αρώματα, χρώματα, κόλλες, ψεκασμούς με αεροζόλ, σκόνες, κάπνισμα ή να βρεθούν σε περιοχές βιομηχανικής ρύπανσης (συμπεριλαμβάνονται και οι κλειστοί χώροι φαγητού με έντονες μυρωδιές π.χ. ταβέρνες, ψησταριές κτλ).
 3. Εικοσιτέσσερις ώρες πριν και κατά την διάρκεια της 48ωρης συλλογής οι συμμετέχοντες δεν πρέπει να χρησιμοποιήσουν καλλυντικά, λοσιόν ή κρέμες.
 4. Το τελευταίο βραδινό γεύμα την παραμονής της λήψης των δειγμάτων θα αποτελείται από στεγνό μοσχαρίσιο κρέας χωρίς σάλτσες, ψητές ή βραστές πατάτες, με καρότα ή αρακά, ψωμί, παγωτό, καφέ, τσάι ή γάλα. Απαγορεύεται η χρήση μπαχαρικών ή καρυκευμάτων και η κατανάλωση αλκοόλ.
 5. Την παραμονή το βράδυ και το πρωί της λήψης η υγιεινή του στόματος, δοντιών και οδοντοστοιχιών γίνεται με αλατόνερο. Το πρωί της συλλογής οι άνδρες μπορούν να ξυριστούν χωρίς να χρησιμοποιούν λοσιόν μετά το ξύρισμα ή κολόνιες και οι γυναίκες να μην χρησιμοποιήσουν κραγιόν η οποιαδήποτε καλλυντικά αποσμητικού τύπου η μακιγιάζ.
 6. Κάθε εθελοντής πρέπει να έχει εξοικειωθεί με την διαδικασία της λήψης των δειγμάτων.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΗΘΙΚΗΣ ΚΑΙ ΔΕΟΝΤΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΙΑΤΡΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

Διακήρυξη της Χαβάης / II, όπως εγκρίθηκε από τη Γενική Συνέλευση της Παγκόσμιας Ψυχιατρικής Εταιρίας, Βιέννη (10/8/1983)

οέλθει από τον άρρωστο, ο ψυχίατρος θα πρέπει να ζητήσει τη βοήθεια άλλου συναδέλφου του.

1. Ο ψυχίατρος αποβλέπει σε μια θ Ο σκοπός της Ψυχιατρικής είναι να θεραπεύσει την ψυχική αρρώστια και να προάγει την ψυχική υγεία. Ο ψυχίατρος, όσο μπορεί καλύτερα και σύμφωνα με την παραδεγμένη επιστημονική γνώση και τις ηθικές αρχές, οφείλει να υπηρετεί το καλύτερο συμφέρον του αρρώστου και επίσης να ενδιαφέρεται για το κοινό καλό και μια δίκαιη κατανομή των δυνατοτήτων υγείας. Για να εκπληρώσει αυτούς τους σκοπούς χρειάζεται αδιάκοπη έρευνα και συνεχής εκπαίδευση του προσωπικού υπηρεσιών υγείας, των ασθενών και του κοινού.
2. Κάθε ψυχίατρος θα πρέπει να προσφέρει στον άρρωστο την καλύτερη δυνατή θεραπεία σύμφωνα με τις γνώσεις του και εφόσον γίνει αποδεκτή, πρέπει να τον θεραπεύει με την φροντίδα και το σεβασμό που οφείλεται στην αξιοπρέπεια όλων των ανθρώπων. Όταν ο ψυχίατρος είναι υπεύθυνος για θεραπεία που δίνεται από άλλους, οφείλει σ' αυτούς την κατάλληλη επίβλεψη και εκπαίδευση.
3. Οποτεδήποτε υπάρξει ανάγκη ή οποτεδήποτε μια εύλογη απαίτηση πρ εραπευτική σχέση που θεμελιώνεται σε αμοιβαία συμφωνία. Στην άριστη περίπτωση, απαιτεί εμπιστοσύνη, εχεμύθεια συνεργασία και αμοιβαία υπευθυνότητα. Μια τέτοια σχέση μπορεί να μην είναι δυνατόν να επιτευχθεί με ορισμένους ασθενείς. Σε μια τέτοια περίπτωση, η επαφή θα πρέπει να εξασφαλίζεται με ένα συγγενή ή με άλλο πρόσωπο με στενή σχέση με τον άρρωστο. Εάν και όταν εγκαθίσταται μια σχέση με σκοπούς άλλους από τους θεραπευτικούς, όπως στην ψυχιατροδικαστική, η φύση της θα πρέπει να εξηγείται αναλυτικά στο πρόσωπο που αφορά.
4. Ο ψυχίατρος θα πρέπει να πληροφορήσει τον άρρωστο για τη φύση της κατάστασής του, για τις θεραπευτικές διαδικασίες, που θα περιλαμβάνουν και δυνατές εναλλακτικές και για την πιθανή έκβαση. Οι πληροφορίες αυτές πρέπει να παρέρχονται με τρόπο σαφή και συνετό και θα πρέπει να δίνεται στον άρρωστο η δυνατότητα να επιλέξει ανάμεσα σε κατάλληλες και διαθέσιμες θεραπευτικές μεθόδους.
5. Καμιά διαδικασία δε θα πρέπει να γίνεται και καμιά θεραπεία να εφαρμόζεται αντίθετα ή ανεξάρτητα από τη θέληση του ίδιου του αρρώστου, εκτός εάν λόγω ψυχικής νόσου δεν μπορεί να διαμορφώσει κρίση για το τι είναι προς το καλύτερο συμφέρον του και εάν χωρίς αυτή τη θεραπεία είναι πιθανό να συμβούν σοβαρές συνέπειες στον ίδιο ή σε άλλους.
6. Ευθύς όταν οι λόγοι για αναγκαστική θεραπεία παύσουν να ισχύουν, ο ψυχίατρος θα πρέπει να ελευθερώσει αμέσως τον άρρωστο από τον αναγκαστικό τρόπο θεραπείας και στην περίπτωση που παραπέρα θεραπεία είναι απαραίτητα, θα πρέπει να εξασφαλίσει τη συγκατάθεσή του. Ο ψυχίατρος θα πρέπει να πληροφορήσει τον άρρωστο ή και τους συγγενείς του ή άλλα σημαντικά γι' αυτόν

πρόσωπα για την ύπαρξη μηχανισμών ένστασης κατά της κράτησής του και για τυχόν άλλη καταγγελία που σχετίζεται με την προσωπική του ευημερία.

7. Ουδέποτε ο ψυχίατρος θα πρέπει να χρησιμοποιήσει τις επαγγελματικές του δυνατότητες για να βλάψει την αξιοπρέπεια ή τα ανθρώπινα δικαιώματα οποιουδήποτε ατόμου ή ομάδας και ουδέποτε θα πρέπει να επιτρέψει να υπεισέλθουν στη θεραπεία ανάρμοστες προσωπικές επιθυμίες, συναισθήματα, προκαταλήψεις ή πεποιθήσεις. Ο ψυχίατρος με κανένα τρόπο δε θα πρέπει να χρησιμοποιήσει τα μέσα του επαγγέλματός του, εφόσον έχει βεβαιωθεί απουσία ψυχικής νόσου. Εάν ο άρρωστος ή κάποιο τρίτο μέρος ζητούν πράξεις αντίθετες προς την επιστημονική γνώση ή τις ηθικές αρχές, ο ψυχίατρος πρέπει να αρνείται να συνεργαστεί.
8. Οτιδήποτε ο ψυχίατρος έχει ακούσει από τον άρρωστο ή έχει καταγράψει κατά τη διάρκεια της εξέτασης ή της θεραπείας, πρέπει να κρατηθεί εμπιστευτικό, εκτός εάν ο άρρωστος τον αποδεσμεύσει από αυτή την υποχρέωση ή εάν, για να προληφθεί σοβαρή βλάβη στον ίδιο ή σε τρίτους, η αποκάλυψη γίνεται αναγκαία. Στις περιπτώσεις αυτές ο άρρωστος θα πρέπει να ενημερωθεί για την παραβίαση του απορρήτου.
9. Για την αύξηση και τη διάδοση των ψυχιατρικών γνώσεων και δεξιοτήτων απαιτείται συμμετοχή των αρρώστων. Συγκατάθεση μετά από ενημέρωση πρέπει οπωσδήποτε να εξασφαλιστεί πριν ένας άρρωστος παρουσιαστεί σε μια αίθουσα διδασκαλίας και ακόμη, εάν είναι δυνατό, όταν ένα ιστορικό δίνεται για επιστημονική δημοσίευση, όπου όλα τα εύλογα μέτρα πρέπει να παρθούν για να προστατεύσουν την αξιοπρέπεια και την ανωνυμία του αρρώστου και να διαφυλάξουν την προσωπική του υπόληψη. Η συμμετοχή του αρρώστου πρέπει να είναι εκούσια και αφού προηγουμένως έχει γίνει πλήρης ενημέρωση για το σκοπό, τις διαδικασίες, τους κινδύνους και τις ενοχλήσεις ενός ερευνητικού προγράμματος και πρέπει να υπάρχει μια λογική σχέση ανάμεσα στους υπολογιζόμενους κινδύνους ή τις ενοχλήσεις και του οφέλους από αυτή μελέτη. Στην κλινική έρευνα κάθε άτομο πρέπει να διατηρεί και να ασκεί όλα τα δικαιώματά του ως αρρώστου. Για παιδιά και άλλους αρρώστους που δεν μπορούν από μόνοι τους να δώσουν συγκατάθεση, αυτή θα πρέπει να εξασφαλίζεται από τους νόμιμους πλησιέστερους συγγενείς. Κάθε άρρωστος ή άτομο που συμμετέχει στην έρευνα είναι ελεύθερος να αποσυρθεί για οποιονδήποτε λόγο και σε οποιαδήποτε χρόνο από κάθε εκούσια θεραπεία και από κάθε διδακτικό ή ερευνητικό πρόγραμμα στο οποίο συμμετέχει. Η διακοπή αυτή καθώς και κάθε άρνηση να συμμετάσχει σε ερευνητικό πρόγραμμα, δεν θα πρέπει κατά κανένα τρόπο να επηρεάσει τις προσπάθειες του ψυχιάτρου να βοηθήσει τον άρρωστο ή το άτομο.
10. Ο ψυχίατρος θα πρέπει να διακόψει όλα τα θεραπευτικά, διδακτικά και ερευνητικά προγράμματα που μπορεί να έρχονται σε αντίθεση με τις αρχές αυτής της Διακήρυξης.



Preliminary investigation of using volatile organic compounds from human expired air, blood and urine for locating entrapped people in earthquakes

M. Statheropoulos^a, E. Sianos^a, A. Agapiou^{a,*}, A. Georgiadou^a, A. Pappa^a,
N. Tzamtzis^a, H. Giotaki^b, C. Papageorgiou^c, D. Kolostoumbis^c

^a National Technical University of Athens (NTUA), School of Chemical Engineering, Sector I, 9 Iroon Polytechniou Str., Athens 157 73, Greece

^b Department of Nursing, TEI of Epirus, Ioannina, Greece

^c Eginition Hospital, 74 Vass. Sophias Aven, Athens 115 28, Greece

Received 14 December 2004; accepted 21 May 2005

Available online 29 June 2005

Abstract

A preliminary investigation on the possibility of using volatile organic compounds (VOCs) determination of expired air, blood and urine, for the early location of entrapped people in earthquakes, has been carried out. A group of 15 healthy subjects has been sampled. The identification of a common “core” of substances might provide indications of human presence that can be used for the development of a real time field analytical method for the on site detection of entrapped people. Expired air samples have been analyzed by thermal desorption GC/MS and VOCs from blood and urine by headspace SPME–GC/MS. Acetone was the only compound found common in all three matrices. Isoprene was found in both expired air and blood samples. Acetone and isoprene along with a number of saturated hydrocarbons were among the major constituents identified in expired air analysis. Various ketones (2-pentanone, 4-heptanone, 2-butanone) were also determined over urine specimens. Using the techniques and methods of field analytical chemistry and technology appears to be the proper approach for applying the results of the present study in real situations.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Blood; Earthquakes; Entrapped people; Expired air; SPME; Thermal desorption; Urine; VOCs

1. Introduction

Volatile organic compounds (VOCs) analysis in expired air, blood and urine has been used for toxicological, medical, forensic, biochemical and other applications [1–6]. Some of these applications involve the correlation of VOCs with medical conditions of various groups of people, as well as, the correlation with biochemical processes and metabolism. As part of a project, which investigates the possibility of using VOCs present in expired air, blood and urine for locating entrapped people in an earthquake, an initial preliminary study has been carried out for the simultaneous detection of these compounds in all three matrices.

Normal human breath is known to contain a complex mixture of several hundred VOCs; more than 3000 different compounds have been observed in a study which involves breath analysis of 50 subjects [7]. Also, VOCs determination in plasma and urine has showed a broad number of compounds such as alcohols, aldehydes, ketones, furans, pyrroles, terpenes, sulphur containing compounds, merkaptans, hydrocarbons and various heterocyclic compounds [8,9]. It should be noted that knowledge concerning the simultaneous determination of VOCs in expired air, blood and urine specimens of the same group of volunteers is limited and not much research work has been reported so far. The aim of this work is to investigate if a relatively small target group of compounds can be determined, preferably, in all three matrices (expired air, urine and blood), so as to eliminate the “overpopulation” of known compounds from the literature. The

* Corresponding author. Tel.: +30 210 7723109; fax: +30 210 7723188.
E-mail address: agapiou@central.ntua.gr (A. Agapiou).

target is to determine, if possible, a core of substances that will act as a trace of the presence of a human being trapped under the ruins of a building.

In this work, Sorbent Tube sampling with thermal desorption GC/MS was used for the determination of VOCs found in expired air. In addition, headspace-solid phase micro extraction (HS-SPME)-GC/MS was applied for the analysis of VOCs evolved from urine and blood specimens. It should be emphasized that these methods are frequently referred in literature for this kind of analysis. They provide full mass spectra (chemical identification) that is used for identifying the type of compound in addition to its molecular weight and retention time. On the other hand, these methods are time-consuming limiting thus their real time application.

Other methods applied for the analysis of expired air include selected ion flow tube-mass spectrometry (SIFT-MS), proton transfer reaction-mass spectrometry (PTR-MS), membrane extraction with sorbent interface (MESI), ion mobility spectrometers (IMS) based methods, laser spectroscopy and non-specific sensor arrays technology (electronic noses) [10,11]. SIFT-MS provides low sensitivity (ppb) and is based on soft ionization mass spectrometry selectively applied in trace gases in expired air. It has very low time of analysis and uses three different chemical ionization agents (H_3O^+ , NO^+ , O_2^+). It requires minimum sample preparation and no separation of analytes [12]. PTR-MS can provide real time analysis and highly sensitive measurements for specific target VOCs although their identification is based on molecular mass and thus it is possible interferences from various molecular species to appear. Although it lacks chemical identification possibility, it requires no sample separation and it can be used for fast screening purposes based on molecular masses [13–15]. MESI is using a membrane that is selective for non-polar and volatile substances. It overcomes the usual problems in breath analysis (sample storage, high moisture, volatility) [16]. IMS is a low cost, portable (even miniaturized) device appropriate for field breath analysis. It has very low sensitivity, which can be improved by using different carrier gases [17]. Laser spectroscopy has also been referred in measuring ethane in exhaled air at ppt range [18]. Electronic noses with current technology need preconcentration, as well as chemometric processing which is available mostly in exploratory mode, not fully automated [19].

It should be noted that the study presented in this paper, is a starting point for the whole project, which exhibits complexity because the medical conditions of entrapped people resembles to that of fasting, stressed and heavily injured. Furthermore, the detection process needs to be modeled on the side of mass transfer of VOCs derived from breath and body fluids to the sampling device. Following this need for initial results, all the analyses have been done with the help of healthy volunteers, which has been verified by standard biochemical tests not showing pathological values.

Regardless of the analytical and sampling compromises that have to be made for the initial results, the project is focused on entrapped people and for this reason all the SPME

analyses have been done without any pretreatment in order to produce the maximum yield of VOCs (addition of salts, adjustment of pH, heating and agitation) [20,21]. Following this need, the urine and blood samples have been analyzed within 24 h from the collection time, so as artifacts from sample degradation not to be measured. To achieve fast analysis, the sampling procedure has been split in 3 days, in order to reduce the sample flow of samples to the lab to one-third per day, which is sufficiently low for almost immediate analysis.

2. Experimental

2.1. Human subjects

Fifteen healthy volunteers were selected, comprising 10 males (mean age 33) and 5 females (mean age 28). All subjects have signed a voluntary participation statement and have been informed about the terms of the Hawaii declaration on "Ethics protocol on medical experiments". The protocol for the preparation of the volunteers was as presented in [22].

2.2. Expired air sampling

Expired air was chosen to be sampled in 51 Tedlar bags. All volunteers were asked to blow calmly air into the Tedlar bag by mouth, while inspiring from the nose. Three-layer sampling tubes have been chosen (TD-300, Alltech) due to the high diversity of structure and molecular weight of the compounds expected to be analyzed. The 6 mm o.d., 115 mm length tubes consisted of 300 mg Carbograph2, 200 mg Carbograph 1 and 125 mg Carbosieve S-III layers. All sampling tubes were conditioned for 2 h, at 300 °C and at a flow of 150 ml min⁻¹ of He, in order to minimize background effects and spiked with 1 µl liquid volume of 50 mmol l⁻¹ methanolic solution of chlorobenzene-D5 (ISTD).

The air from the bag was pumped through the sampling tube, with the use of a sampling pump (VSS-1, A.P. Buck, USA). The removal of air was carried out using constant-flow mode (the VSS-1 pump automatically adjusted the pressure gradient to obtain selected flow) at 200 ml min⁻¹. Blank ambient air samples were taken from the sampling location. In order to preserve sample integrity, the VOC content of the air in Tedlar bags was, immediately, transferred to the sorbent sampling tubes.

The in-house made sorbent desorption system has been thoroughly tested and its performance has been evaluated before the analysis of this work. Evaluation procedures for the cryo trap total condensation ability and sorbent tube thermal desorption duration were applied. Furthermore, evaluation procedures on sorbent trapping efficiency were also performed on the system. Detection limit for hexane was found to be lower than 10 ng, when the system worked as an injector. System linearity exhibited r^2 value of 0.986 for calibration curves at nanogram to low microgram region and value 0.943 for microgram to low milligram mass region. Reproducibility

experiments by injecting 2 μl of 0.001% hexane in toluene solution showed R.S.D. of 5.24%.

2.3. Expired air VOCs chromatographic analysis

Sorbent tubes were thermally desorbed to a HP 5890/5972 GC/MS (Agilent Technologies) system, using an in house made thermal desorption unit (TDU). Other than the thermal desorption module it includes a refocusing trap based on freezing with liquid nitrogen, in order to enhance the chromatographic separation. System's schematic drawing is shown in Fig. 1.

Desorption flow of He has been set to 30 ml min^{-1} , while the temperature was kept constant at 200 °C. Desorption and refocusing duration was 20 min in order to ensure 100% recovery of sorbent-trapped analytes. The cryo trap capillary was a 22 cm part of a 0.53 mm i.d., AT-Q PLOT column (Alltech) and it was chosen in order to enhance trapping of highly volatile VOCs, as shown in literature [23]. A 20 s heating pulse has proved to be adequate for flash desorption of trapped analytes into the GC column.

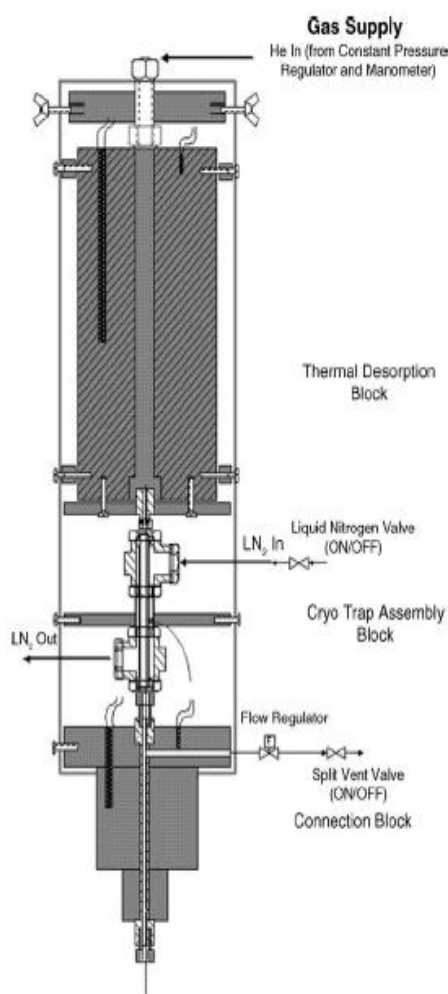


Fig. 1. Drawing of the in-house made TDU.

A 60 m SPB-624 capillary column with 1.4 μm stationary phase and internal diameter of 0.25 mm (Supelco) has been utilized for high-resolution chromatographic separation. Column head pressure of helium purge gas has been set to 25 psi. GC program has been selected as follows: 35 °C initial for 5 min, ramp of 4 °C min^{-1} up to 180 °C, holds for 20 min. MSD mass range has been limited to 42–350 amu range due to the expected detection of VOCs, but with a benefit of 1.8 scan s^{-1} .

2.4. Expired air VOCs quantification method

Chromatographic peaks have been identified with the help of Wiley 138 mass spectrum library, using similarity indexes higher than 70%. Quantitative results were generated with the application of internal standard method [24], using the following equation:

$$C_i = \frac{A_i}{A_{\text{ISTD}}} \frac{1}{\text{RRF}_i} C_{\text{ISTD}}$$

where C_i is the concentration of the substance i in the vapor phase expressed in nmol l^{-1} of expired air; A_i the peak area of substance i , in counts; A_{ISTD} the peak area of internal standard, in counts; RRF_i the response factor of substance i , relative to chlorobenzene- d_5 , which expresses the different ionization of the substance i compared to the internal standard; and C_{ISTD} is the calculated concentration of internal standard in the total air volume sampled in nmol l^{-1} .

The concentration calculation for the internal standard has been done by reducing the known molar quantity injected on the tube to the 5 l of air sampled from the Tedlar bags. This concentration is calculated to be equal to 10 nmol l^{-1} .

2.5. Blood and urine sampling

All blood and urine samples have been collected immediately after giving samples of expired air, at the medical laboratory of Aiginiteion Hospital of Athens, Greece, under the same conditions a typical medical examination would require. Two duplicate samples of 5 ml for each blood and urine were collected. Each sample was placed immediately to 15 ml vials and capped firmly (15 ml vials, with an open top screw cap type 18/400 sealed with TFE/silicon liners type 18/400, 10/50 ml, supplied by Alltech). One sample of the duplicate pairs was transferred to a deep-freezer for storage and future confirmation use and the other sample to the lab for analysis.

The volunteers were divided in three groups and followed the sampling procedure at sequential days, in order to reduce the sample flow in the analytical laboratory to 10 per day (five blood and five urine). All blood and urine samples along with their water blanks (one each day) were analyzed for headspace VOCs within 20 h from collection time.

2.6. Urine and blood VOCs chromatographic analysis

All urine and blood VOCs analysis have been performed with 85 μm carboxen/polydimethylsiloxane (PDMS) on a StableFlex SPME fiber, supplied by Supelco. The SPME needle holder pierced the TFE/silicon vial seal and the fiber was exposed to the headspace vapor for 30 min. Samples brought to the lab have been injected with 0.5 μl of methanolic mixture containing 50 mmol l^{-1} chlorobenzene-D5, used as internal standard (IT-Chem, Hellas) and have been left to equilibrate for 30 min prior to SPME sampling.

Desorption of VOCs from the SPME fiber has been carried out at the heated split/splitless injection port of a HP5890 GC coupled by a HP 5972 MSD (Agilent Technologies). Injection port temperature has been kept constant at 220 $^{\circ}\text{C}$ and its mode of operation has been selected to be splitless during fiber exposure in the heated zone and switched to injector purge mode (split) at 4 min run time. Injector flow has been set to 30 ml min^{-1} . The set of GC/MS instrumental parameters has been kept identical with the expired air analysis one, in order to produce comparable results. Only the electron multiplier voltage has been set to 200 V higher than the autotune value in order to enhance the detection ability of the MSD. Substances have been identified using the same procedure with the expired air VOCs analysis.

3. Results and discussion

3.1. Expired air VOCs

Breathing is known to be a dynamic process and VOCs detected are continuously changing according to the physical and physiological status and the current environment of the person examined. In order to ensure the “physiological” status of each of the subjects biochemical tests have been conducted. These included 63 different medical parameters to be measured (e.g. cholesterol levels, sugars, white blood cells) and psychological profiling. In order to eliminate the environmental VOCs effect, the subjects were asked to stay for 1 h in the same room that had previously been sampled for atmospheric VOCs. Each substance detected in the expired air sample was compared to the room “blank” sample and only the substances with concentrations over three times higher than the blank were reported. A typical chromatogram of expired air analysis is presented in Fig. 2.

VOCs expired air analyses for the 15 volunteers resulted in 63 VOCs to be identified including hydrocarbons, alcohols, ketones, aldehydes, acids, esters, chlorinated hydrocarbons, aromatics and heterocyclic compounds. The expected “core” of VOCs that may lead to a “human trace” are shown in Table 1. Table 1 presents indicative median concentrations of VOCs found in expired air samples showing more than 80% appearance in the human subjects and their median concentration. The fourth column presents the relative concentration of each of the substances if compared to the concentra-

Table 1
VOCs identified in expired air

Compound	Indicative median concentration (nmol l^{-1})	Appearance (%)	Relative response to acetone (%)
Acetone	11.7	100	100
Pentane, 2-methyl	6.81	100	58.2
Hexane	6.22	100	53.2
Isoprene	3.91	100	33.4
1-Pentene, 2-methyl	3.16	100	27.0
Hexane, 3-methyl	1.99	100	17.0
Methane, chloro-	1.39	93	11.9
Benzene	1.35	93	11.5
Heptane, 2,4-dimethyl	1.07	93	9.14
Hexane, 2-methyl	0.98	87	8.38
Acetaldehyde	0.92	93	7.86
Hexane, 2,3-dimethyl	0.56	87	4.79
Alpha pinene	0.05	87	0.43

tion of acetone (substance-to-acetone ratio, STA ratio). Six substances were found to be common in all the samples examined: isoprene, acetone, pentane 2-methyl, 1-pentene 2-methyl, hexane, and hexane 3-methyl while other seven showed more than 80% appearance. These substances are showing STA ratio over or close to 15 and 100% appearance in all samples.

The VOCs median concentration findings obtained from this study such as acetone (11.7 nmol l^{-1}) and isoprene (3.91 nmol l^{-1}) have showed agreement with previous reports referring values of 10–48.4 nmol l^{-1} for acetone [25] and 1.60–10.3 nmol l^{-1} for isoprene [1]. Alternatively, acetone content given by other authors has presented mean values of 38 or 18.9 nmol l^{-1} [26,27] and for isoprene 14.5 or 48.5 nmol l^{-1} [28,29]. Although ethanol and pentane showed slightly lower appearance below 80%, their STA ratio should not be overlooked (median concentrations of 5.32 and 1.65 nmol l^{-1} and STA ratios of 45.3 and 14.1%, respectively, for ethanol and pentane), as they are considered among the main VOCs of human breath. The levels of hydrocarbons identified were not expected. Exhaled hydrocarbons are correlated with lipid peroxidation and the possible explanation is that volunteers were asked to follow a certain preparation protocol. For further testing the repeatability, thermal desorption system stability and within person variability, an examination on three samples of the same individual was carried out. The results defined that the number of the VOCs identified were analogous for each measurement for over 97%, whereas the within-individual variability was found 70%.

3.2. Urine and blood VOCs

The total number of substances identified for blood and urine, is 46 and 38, respectively. Chemically, they show the same diversity as those of expired air including hydrocarbons, alcohols, ketones, aldehydes, sulphides and heterocyclic compounds. Results for blood VOCs common in all samples or with appearance over 80% (“core substances”) are shown

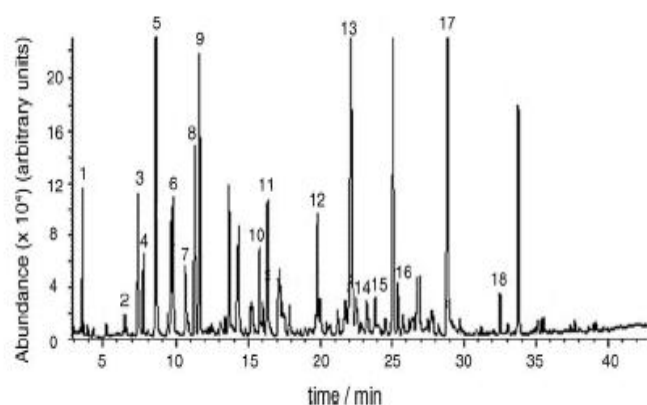


Fig. 2. Typical chromatogram obtained by an expired air test measurement. Compounds detected: (1) chloro methane, (2) pentane, (3) isoprene, (4) ethanol, (5) acetone, (6) 2-methyl pentane, (7) 3-methyl pentane, (8) 2-methyl pent-1-ene, (9) hexane, (10) 2-methyl hexane, (11) 3-methyl hexane, (12) acetic acid, (13) 4-methyl heptane, (14) 1,2-dimethyl-trans cyclohexane, (15) toluene, (16) 2,4-dimethyl heptane, (17) *d*₅-chlorobenzene—internal standard, and (18) alpha pinene. Sampling and chromatographic conditions are given in the text.

Table 2
VOCs identified in the air phase of blood samples

VOCs	Appearance (%)	Relative response to acetone (%)
Acetone	100	100
Isoprene	87	4.60
Butane, 2,2,3,3-tetramethyl	100	0.45
Toluene	100	0.24
Phenol	80	0.21

on Table 2. Only three substances were identified in all samples: acetone, butane 2,2,3,3-tetramethyl and toluene while isoprene and phenol show the higher tendency of existing in all samples. However, STA ratio results using the amount of those substances collected on the SPME needle looks promising only for acetone–isoprene pair. The other substances have been detected, but with low STA ratio.

“Core” substances for human urine are summarized in Table 3. Those with 100% appearance are five: acetone, hexane 2,2-dimethyl, toluene, 1H-pyrrole and *p*-xylene. Moreover, ethanol, 2-butanone, benzene, 2-pentanone, 4-heptanone and phenol were identified over 80% in samples examined. Significant responses compared to that of acetone, with STA ratio over 5%, have been observed for the ketone

Table 3
VOCs identified in the air phase of urine samples

VOCs	Appearance (%)	Relative response to acetone (%)
Acetone	100	100
2-Pentanone	87	15.3
4-Heptanone	87	6.86
1H-pyrrole	100	6.37
2-Butanone	87	2.80
Toluene	100	2.60
Benzene	93	1.31
Ethanol	87	1.20
Hexane 2,2-dimethyl	100	1.01
<i>p</i> -Xylene	100	0.39
Phenol	87	0.28

part of the substances detected, while the hydrocarbon portion is detected in very low STAs.

The stability of the results and method repeatability was tested by examining duplicate samples stored in deep freezing. Blood and urine samples of three individuals (duplicates) were analyzed after 30 days of storage. It has been reported that all chemical in urine specimens are stable in -20°C storage conditions, up to 2 months [30]. These results were compared with the initial results for the three subjects. The observations that have been made, pointed out analogous results for urine and blood samples of the three subjects at 90 and 80%, respectively.

The findings, presented in Tables 2 and 3, suggest that there is a variation among the volatiles of the vapor phase in blood and urine samples, among different individuals, as it has been already reported [8]. It is characteristic that three of the 46 compounds identified in blood are common for all the subjects and five out of 38 in urine. However, VOCs in urine samples of the volunteers seem to have less variation compared to blood samples. It appears that 13 of 38 compounds in urine were identified in over 80% of the samples and 18 in over 50% (not shown on Tables 2 and 3). In blood five compounds were present in over 80% of the samples and seven compounds over 50%.

4. Conclusions

Human expiration is a continuous function so the main part of VOCs detected from entrapped people in an instance of an earthquake is expected to come from it. Acetone has been found to be present in all three matrices (expired air, blood and urine) so the response to the analytical device is thought to be cumulative and this substance is expected to be the first one detected when measuring under ruins. Moreover, the verification of human presence can be enhanced by the detection of isoprene (found in both expired air and urine) at STA ratios close to 10–30%. Finally, the six compound core,

found in expired air, and the STA ratios of each substance can be used as a starting point for the construction of the on-site detection method.

Ketone content of air sampled under building ruins can alternatively be used for the detection of entrapped people as urine analysis showed. The expected concentration of ketones is estimated to be low, even at trace amounts, because humans produce limited amounts of urine and the dehydrated states when entrapped are expected to minimize urine production. However, every one of the substances detected and shown on Tables 1–3 may be specific enough to imply the presence of a human being if they are not found in normal indoor air or they are not produced by other background sources.

Human “odor”, regarding VOCs, has been used in search and rescue operations, as dogs have been used to detect earthquake victims ever since organized rescue services were instated. However, the analytical findings of this feasibility study have been obtained by time-consuming laboratory based methods. Consequently, the employing of field chemical analysis and technology which utilizes portable and mobile instruments for direct measurements in time and space ought to be investigated [31]. Portable sensors and instruments (e.g. MS-based systems) or electronic noses might prove appropriate for this purpose. The introduction of chemical analysis in physical catastrophes may prove effective in early location of entrapped people.

5. Future works

The research project is planned to continue measuring more parameters of the detection procedure. Human disorders in metabolism when entrapped are known to resemble to states of fasting or extremely stressed. Also, measurements on sick or multi-injured persons can produce valuable data on the VOCs detected after some hours or days following the earthquake.

Dead humans or even dead animals can produce background VOCs that may be common with those of living people making the detection method hard to distinguish [32]. Other parameters that are possible to inhibit VOC detection, in an earthquake, are environmental background substances (e.g. indoor or outdoor air), particulate matter, VOCs from construction materials, broken pipes, plants and entrapped animals. All of these background sources will be the focus of future investigations.

Acknowledgements

This study is part of a project, financially supported by the Greek Earthquake Planning and Protection Organization and the General Secretariat of Research and Technology, PENED 2001. The authors acknowledge the support of Mrs. C. Nikolaou (Assistant Professor in National and Kapodistrian University of Athens, Department of Medicine) for the

overall supervision of the clinical tests, carried out at Biochemical Analytical Laboratory of “Aiginiteion” Hospital of Athens.

References

- [1] S. Mendris, P.A. Sobotka, D.E. Euler, *Free Radiat. Res.* 23 (1995) 117.
- [2] S.K. Kundu, J.A. Bruzek, R. Nair, A.M. Judillay, *Clin. Chem.* 39 (1993) 87.
- [3] A.W. Jones, *Clin. Chim. Acta* 146 (1985) 175.
- [4] A. Manolis, L.J. Burney, B.A. Bobbie, *Clin. Biochem.* 16 (1983) 229.
- [5] L. Junting, C. Peng, O. Suzuki, *Forensic Sci. Int.* 97 (1998) 93.
- [6] G.A. Mills, V. Walker, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 267.
- [7] M. Phillips, J. Herrera, S. Krishnan, M. Zain, J. Greenberg, R.N. Cataneo, *J. Chromatogr. B* 729 (1999) 75.
- [8] A. Zlatkis, R.S. Brazell, C.F. Poole, *Clin. Chem.* 27/6 (1981) 789.
- [9] H.G. Wahl, A. Hoffmann, D. Luft, H.M. Liebich, *J. Chromatogr. A* 847 (1999) 117.
- [10] N. Teshima, J. Li, K. Toda, P.K. Dasgupta, *Anal. Chim. Acta* 535 (2005) 189.
- [11] W. Miekisch, J.K. Schubert, G.F.E. Noeldge-Schomburg, *Clin. Chim. Acta* 347 (2004) 25.
- [12] D. Smith, P. Spanel, S. Davies, *J. Appl. Physiol.* 87 (1999) 1584.
- [13] B. Moser, F. Bodrogi, G. Eibl, M. Lechner, J. Rieder, P. Lirk, *Respir. Physiol. Neurobiol.* 145 (2005) 295.
- [14] A. Amann, G. Poupart, S. Telsler, M. Ledochowski, A. Schmid, S. Mechtcheriacov, *Int. J. Mass Spectrom.* 239 (2004) 227.
- [15] P. Lirk, F. Bodrogi, J. Rieder, *Int. J. Mass Spectrom.* 239 (2004) 221.
- [16] H. Lord, Y. Yu, A. Segal, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5650.
- [17] V. Ruzsanyi, J.I. Baumbach, S. Sielemann, P. Litterst, M. Westhoff, L. Freitag, *J. Chromatogr. A*, in press.
- [18] H. Dahnke, D. Kleine, P. Hering, M. Murtz, *Appl. Phys. B* 72 (2001) 971.
- [19] C.D. Natale, A. Macagnano, E. Martinelli, R. Paolesse, G. D’Arcangelo, C. Roscioni, A.F. Agro, A. D’Amico, *Biosens. Bioelectr.* 18 (2003) 1209.
- [20] G.A. Mills, V. Walker, *J. Chromatogr. B* 753 (2001) 259.
- [21] G.A. Mills, V. Walker, H. Mughal, *J. Chromatogr. B* 723 (1999) 281.
- [22] B. Krotoszynski, G. Gabriel, H. O’Neil, *J. Chromatogr. Sci.* 15 (1977) 239.
- [23] A.J. Bordening, C.W. Wilkerson, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2874.
- [24] W.A. McClenny, M.W. Holdren, *Compendium of methods for the determination of toxic compounds in ambient air, Method TO-15, Determination of volatile organic compounds (VOCs) in air collected in specially-prepared canisters and analyzed by gas chromatography/mass spectrometry, EPA, Cincinnati, 1997.*
- [25] M. Phillips, J. Greenberg, *J. Chromatogr. B* 422 (1987) 235.
- [26] C. Grote, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 69 (1997) 587.
- [27] A.W. Jones, *J. Anal. Toxicol.* 9 (1985) 246.
- [28] M. Phillips, M. Sabas, J. Greenberg, *Am. J. Clin. Pathol.* 46 (1993) 861.
- [29] A. Cailleux, X. Moreau, A. Delhumeau, P. Allain, *Biochem. Med. Metab. Biol.* 49 (1993) 321.
- [30] S. Fustinoni, R. Giampiccolo, S. Pulvirenti, M. Buratti, A. Colombi, *J. Chromatogr. B* 723 (1999) 105.
- [31] G. Matz, W. Schroeder, A. Harder, A. Schillings, P. Rechenbach, *Field Anal. Chem. Technol.* 1 (1997) 181.
- [32] M. Statheropoulos, C. Spiliopoulou, A. Agapiou, *Forensic Sci. Int.*, in press.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Chromatography B, 832 (2006) 274–279

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY B

www.elsevier.com/locate/chromb

Analysis of expired air of fasting male monks at Mount Athos

M. Statheropoulos, A. Agapiou*, A. Georgiadou

National Technical University of Athens (NTUA), School of Chemical Engineering, Sector I, 9 Iroon Polytechniou Street, Athens 157 73, Greece

Received 12 September 2005; accepted 19 January 2006

Abstract

Expired air chemical analysis is investigated as a search and locate method for the early detection of entrapped people under the ruins of collapsed buildings after an earthquake. Fasting individuals were examined as a group that simulates the medical status of some of such victims. Exhaled air from seven fasting male monks (after 63 h) was analysed using thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry (TD–GC–MS) analysis. Over 150 volatile organic compounds (VOCs) were identified and the 43 most frequent are presented. Acetone showed by far the highest “positive alveolar gradient”. Other compounds included phenol, di-limonene, 2-pentanone, isoprene and acetaldehyde. Quantitative results showed a 30-fold increase of acetone concentration (5.8 ppmv) compared to control measurements of a volunteer. Breath acetone was also identified through a portable gas chromatography-ion mobility spectrometer showing possible, under certain conditions, effectiveness of the method in the field.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Expired air; VOCs; Fasting; Breath; Earthquake; TD–GC–MS; Ion mobility spectrometry

1. Introduction

Human breath is a bulk matrix consisting of nitrogen, oxygen, carbon dioxide, water vapor, inert gases and some trace components; volatile organic compounds (VOCs). This fraction is produced in the range of nmol/l–pmol/l (ppbv–pptv). Endogenous VOCs have gained scientific interest as diagnostic screening tools for monitoring metabolic and biochemical processes in the body [1,2]. The pulmonary alveolar membrane of the lung separates alveolar air from blood in the capillaries. VOCs can diffuse across the alveolar membrane from blood into the air and vice versa [3]. VOCs in exhaled air originate from biochemical processes within the human body, nutrition and the environment. When blood borne, their route depends on Henry’s constant; molecular weight and hydrophobicity [4]. Currently, a common use of breath analysis is that of alcohol determination. Measurement of ethanol in breath through portable analyzers (alcoholometers) is based on its direct relation to the concentration in blood. A breath-to-blood ratio of 1:2100 is used when alcoholometers are calibrated to reflect blood alcohol concentrations [5]. Among several other useful clinical applications, breath VOCs are utilized in the detection of lung

cancer and the prediction of heart and lung transplant rejections [6–8].

The purpose of our continued work is to investigate the use of breath analysis for the early location of entrapped people (i.e. in earthquakes). Earthquakes might cause massive destruction with many human casualties without warning. There is an urgent need for early location, medical support and rescue of entrapped people as the survival rate dramatically decreases in time [9]. Survivors are often trapped in voids of ruins, usually dehydrated and starved. VOCs, along with inorganic gases, can be piled up and an aerial odour (plume) may be created trailing in the direction of air currents. Expired air VOCs, along with volatiles of other biological fluids (blood, urine and sweat), might give indications of human life [10] or loss [11]. To study expired air under similar situations one needs to find volunteers for providing breath samples. However, identification of a group of volunteers undergoing starvation for 72 h (crucial time for search and rescue operations) for experimentation purposes may be difficult to find.

The source and physiological significance of most of VOCs in expired air is still unknown. However, among substances produced endogenously, acetone is considered the most abundant compound in human breath and has attracted scientific attention. Acetone is mainly formed by decarboxylation of acetoacetate and dehydrogenation of isopropanol [12]. It is produced by lipolysis, absorbed into the blood stream and is

* Corresponding author. Tel.: +30 210 7723109; fax: +30 210 7723188.
E-mail address: agapiou@central.ntua.gr (A. Agapiou).

mostly excreted in expired air. As shown by Lord et al. [13], the concentration of acetone in breath changes during the day depending on the amount of carbohydrates received in the diet. Acetone is markedly influenced by the period of fasting [14], starvation or even type of diet [15]. Moreover, elevated acetone concentrations are produced in patients with uncontrolled diabetes mellitus [16]. However, acetone as a product of intermediary metabolism might vary widely between and within subjects [17,18]. Despite the obvious importance and interest in the analysis of expired air of fasting people, few authors have published complete trace component analysis in such conditions.

A variety of sensitive instruments and techniques are employed in expired air analysis. The most frequent include TD–GC–MS [19], solid phase microextraction (SPME) [20], proton transfer reaction-mass spectrometry (PTR-MS) [21], selected ion flow tube-mass spectrometry (SIFT-MS) [22], laser spectroscopy [23] and ion mobility spectrometry (IMS) [24]. Preconcentration on solid sorbent tubes is a widely applicable technique providing semi-quantitative results. On the other hand, IMS is a highly selective detector allowing direct but less specific detection.

The aim of the present study was the preliminary determination of VOCs found in exhaled air of fasting male individuals. For the needs of this work, a selected group of fasting monks volunteered and provided samples of expired air and made this work possible. As part of the religious tradition, all the monasteries located in Mount Athos (Chalkidiki, Greece) abstain from food and water for 3 days at the onset of Easter fast in order to cleanse body and spirit. The 3-day fast begins on a Monday, called “Clean Monday”, and ends on Wednesday. During this severe fasting period the monks only exert their religious obligations in the monastery and refrain from hard work and travel. One of the monasteries which follows this tradition for years is the Great and Holy Monastery of Vatopaidi; it stands on the coastline of a gulf in the center of the north-eastern side of the Athos peninsula, next to the Aegean sea.

After the identification of fasting breath VOCs, a classification of compounds according to “alveolar gradient” (abundance in breath minus abundance in air) for the most common substances was performed. Substances showing positive alveolar gradient (rate of synthesis greater than the rate of clearance) and negative alveolar gradient are presented and discussed. Furthermore, the effectiveness of a real time sensitive instrument such as ion mobility spectrometer for the determination of breath VOCs during fasting was investigated.

2. Experimental

2.1. Human subjects

The sample was highly homogeneous as the volunteer monks follow a common daily program and a specific diet. Although the sample is small, it could be considered rare. Seven non-smoking, healthy, white male monks (mean age 32 years, range 24–37 years) of the Great and Holy Monastery of Vatopaidi

(mount Athos), willingly participated in the experiment that took place in March 2004. None had diabetes mellitus or nutritional abnormalities and none took regular medication. They all participated in the 3-day abstinence of food and water. The last meal was served at 7.00 p.m. on Sunday comprising of fish, salad and a glass of wine. Fasting ended on Wednesday at 11.00 a.m. The first meal was a special hot fruit soup called “housafi” consisting of plums, figs, grapes, oranges, etc. One volunteer was monitored at 3, 48 and 63 h with double samples. The other six monks were sampled at the end of the fasting period (63 h).

2.2. Sample collection

Breath sampling was carried out using 5-l tedlar bags (Alltech). Prior use, the bags were cleaned three times by using pure Ar. The subjects were asked to blow into the bag with moderate effort, while inspiring from the nose. The air was immediately transferred to the sorbent tubes with the use of a portable pump at a constant flow of 200 ml min⁻¹. Meanwhile, blank air samples were also taken from the sampling location. Three layer sorbent tubes (6 mm i.d., 115 mm length, 60/80 mesh) consisting of 300 mg Carpopack C, 200 mg Carbograph and 125 mg Carbosieve S-III (Supelco, USA) were employed. The tubes were preconditioned for 2 h, at 300 °C, with constant flow of He at 150 ml min⁻¹. They were then sealed by both Swagelok fitting and PTFE ferrules and stored at 4 °C. Prior sampling, they were spiked with 1 µl of a methanolic standard solution (50 mmol l⁻¹) of chlorobenzene-d5 serving as internal standard (IT-Chem, Greece).

2.3. Equipment and procedures

2.3.1. Sorbent tube desorption

Sorbent tubes were thermally desorbed to an HP 5890/5972 GC/MS system using an in-house-made thermal desorption unit which stands on top of the gas chromatograph. The system has been tested and evaluated for its performance with prior use. Detection limit for hexane was found to be lower than 10 ng when the system worked as an injector. System linearity exhibited an *r*² value of 0.986 for calibration curves at nanogram to a low microgram region. Reproducibility experiments showed R.S.D. less than 5%. Desorption flow of He was set at 30 ml min⁻¹ while the temperature was kept constant at 200 °C. Desorption and refocusing duration was 20 min in order to maximize recovery. The cryo trap capillary was a 22 cm part of a 0.53 mm i.d., AT-Q, Q-PLOT column (Alltech Associates). A 20-s heating pulse (220 °C) has proved to be adequate for flush desorption of trapped analytes in the GC column. Cryogen used was liquid nitrogen.

A 60 m SPB-624 capillary column with 1.4 µm stationary phase and an internal diameter of 0.25 mm (Supelco) was applied for high resolution chromatographic separation. Column head pressure of helium purge gas was set to 25 psi. GC program was selected as follows: 35 °C initial for 5 min, ramp of 4 °C min⁻¹ up to 180 °C, hold for 20 min. Mass range was applied from 35 to 350 amu due to the expected detection of VOCs.

2.3.2. GC-IMS determination

The equipment used was a portable GC-IMS EVM II (Femtoscan, USA) with ^{63}Ni radioactive source (370 MBq). The limit of detection for vapor acetone was found below 100 ppbv. The temperatures of the instrument were set as follows: inlet temperature = 70 °C, GC oven = 70 °C, transfer temperature = 70 °C. The AVS (automated vapor sampling) pressure was at 100 Torr. The cycle time was set at 28 s and the sample time 10,000 ms. The GC column utilized was a 5 m length methyl silicone (DB-1), 0.25 μm film thickness and 500 μm (i.d.). The sample flow rate was set at 25 ml min $^{-1}$. For the determination of acetone using GC-IMS, the tedlar bag was connected to a teflon tube, which was adjusted in front of the inlet of the instrument. GC-IMS peaks were identified using the retention time and drift time of vapor standards in hexane. The vapor calibration standards were prepared as described in the literature [25].

2.3.3. Inorganic gases determination

CO₂ and CO measurements in expired air were also carried out in all volunteers. Thus, double samples of exhaled CO₂ and CO were collected in 21 bags and analyzed by portable sensors (Anagas CD 98 plus, Environmental Instruments, England).

2.3.4. Data management

GC-MS chromatographic peaks have been initially identified with the help of Wiley 138 mass spectrum library and further enhanced by an in house-made substance database using the "Easy ID" tool of HP productivity Chemstation. External standard mixtures purchased from ITChem (Greece) and Sigma-Aldrich (UK) provided the data needed for each record in the database.

For each VOC identified in the chromatogram, the alveolar gradient was determined using the ratio of the area (A) of each compound identified compared to the value obtained from the blank sample, as detailed by Phillips et al. [8,17]:

$$\text{Alveolar gradient} = \frac{A_{\text{VOC in breath}}}{A_{\text{internal standard}}} - \frac{A_{\text{VOC in air}}}{A_{\text{internal standard}}}$$

Alveolar gradient is a correlate of molar concentration and has been used to estimate the relative abundance of each VOC in breath and air. It should be emphasized that this approach adopts the assumption of equilibrium between VOCs in the body and in room air. Further semi-quantitative results were calculated with the internal standard method presented elsewhere [10,11].

3. Results and discussion

A variety of VOCs were identified from the volunteers examined. More than 150 substances were detected. The 43 most frequent substances present in five of seven volunteers were further examined according to their positive or negative alveolar gradient. Table 1 presents the 29 most common VOCs in breath with positive alveolar gradient. Table 2 shows the remaining 14 VOCs with negative alveolar gradient. Fig. 1 demonstrates a typical TD-GC-MS chromatogram of a fasting individual. Fig. 2 shows an IMS spectrum of the same individual recorded by directing the content of the tedlar bag to the inlet of the GC-

Table 1

Breath VOCs in male fasting individuals ranked by abundance (positive alveolar gradients)

VOCs	Mean alveolar gradient ($\times 10^{-2}$)	% Subjects
Acetone	505.96	100
Phenol	16.64	100
di-Limonene	15.34	100
2-Pentanone	1.49	100
Isoprene	0.89	100
Acetaldehyde	0.43	100
n-Octyl acetate	0.42	100
Dichloromethane	0.32	100
Octane	0.25	100
Hexane, 3-methyl	0.23	100
Hexane, 2-methyl	0.19	100
Heptane	0.14	100
2- β Pinene	0.14	90
Heptane, 2-methyl	0.14	90
Heptane, 4-methyl	0.14	90
Heptane, 3-methyl	0.13	80
Carbonic acid, dimethyl ester	0.10	100
Heptane, 2,4-dimethyl	0.10	90
Ethanone, 1-phenyl	0.10	100
Benzene, 1,2,3-trimethyl	0.09	100
Cyclohexane, methyl	0.08	80
Cyclohexanone	0.07	100
Benzene, (1-methylethenyl)	0.06	90
Toluene	0.04	100
Nonane	0.04	100
1-hexanol, 2-ethyl	0.04	100
2-butanone	0.03	100
Cyclohexane, 1,4-dimethyl	0.03	90
Benzene, 1,2-dimethyl	0.001	100

IMS. Acetone was the most abundant substance identified by both techniques.

Acetone is produced by hepatocytes via decarboxylation of excess Acetyl-CoA and is an important physiological metabolic marker in breath. Ketone bodies are oxidized via the Krebs cycle in peripheral tissue. Fasting for 63 h led to a 30-fold increase of acetone content in expired air of the individual with successive measurements. Skrupskii reported a 15-fold increase for individuals after fasting for 24 h [26]. Taking into consideration

Table 2

Breath VOCs in male fasting individuals ranked by abundance (negative alveolar gradients)

VOCs	Mean alveolar gradient ($\times 10^{-2}$)	% Subjects
Ethanol	-2.22	80
Naphthalene	-1.47	100
Benzene, 1-ethenyl-4-ethyl	-0.73	100
Alpha-pinene	-0.44	100
Benzene, 1,3-dimethyl	-0.32	100
Benzene, 1-ethyl-4-methyl	-0.26	100
Nonanal	-0.23	100
Methane, chloro	-0.19	100
Hexanal	-0.12	90
Decanal	-0.11	100
Styrene	-0.09	100
Benzene, ethyl	-0.06	100
Decane	-0.02	100
Benzene	-0.003	100

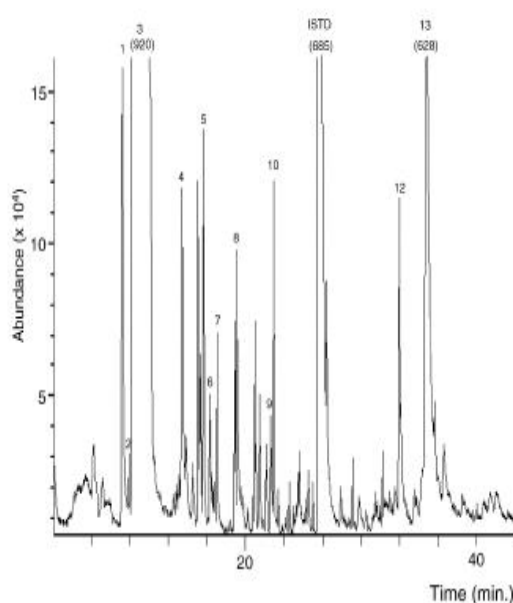


Fig. 1. A typical chromatogram (TD-GC-MS) of a fasting individual. The number in peaks indicate: (1) isoprene, (2) ethanol, (3) acetone, (4) 2-butanone, (5) hexane 3-methyl, (6) benzene, (7) heptane, (8) 2-pentanone, (9) toluene, (10) octane, (11) chlorobenzene d-5 (ISTD), (12) di-limonene, (13) phenol.

the variability between individuals and the analytical difficulties of the methodology used (high water content, possible adsorption in bags, appropriate selection of sorbent tubes, incomplete desorption, breakthrough, memory effects), there may be some loss during the analysis. Consequently, acetone concentration is expected to be even higher.

In normal individuals acetone breath concentration varies between $10\text{--}48.4\text{ nmol l}^{-1}$ (mean 23.2 nmol l^{-1}) [27] or $2.9\text{--}8.9\text{ nmol l}^{-1}$ [28]. Acetone in the control sample of a monk which was taken prior to the onset of fasting was indicatively

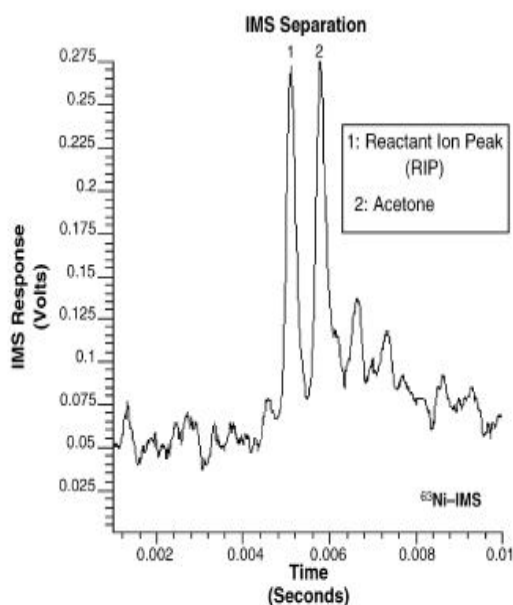


Fig. 2. Ion mobility spectrum of acetone in expired air of a fasting male.

found 8 nmol l^{-1} , which is in close agreement to the literature. On the other hand, Crote and Pawliszyn have reported increased concentrations of acetone ($>50\text{ nmol l}^{-1}$) in the breath of patients suffering from diabetes [20]. The indicative median value of 170 nmol l^{-1} (4.1 ppmv) identified from the monks examined is very close to the range $1.7\text{--}3.7\text{ ppmv}$ reported for diabetic breath [16]. In both situations the mechanism of acetone production is likely the result of lipid mobilization.

It should be noted that during sample taking, the odour of acetone was detectable by smell in the expired air of the monks. The presence of ketone odour in their breath suggests that ketogenesis was taking place (production of ketone bodies: acetoacetate, β -hydroxybutyrate and acetone), resulting from fatty acid oxidation.

Acetone was also detected using GC-IMS analysis; it was identified using both GC retention time (5.32 s) and IMS drift time (5.2 ms). Acetone peak in IMS showed a clear separation from the reactant ion peak (RIP). RIP is formed by chemical ionization of the carrier gas in ambient temperature by ion mobility spectrometers equipped with radioactive ionization sources. It was observed that RIP peak was decreased when acetone was present due to charge transfer. The IMS spectrum was produced in positive polarity at room temperature and ambient pressure. It should be emphasized that the detection of acetone was further verified by the TD-GC-MS analysis of the duplicate sample.

For the same group of volunteers CO_2 and CO measurements in expired air were also carried out. No fluctuations of the CO_2 or CO were observed before and during the fasting procedure. CO was detected only in two volunteers (4 and 2 ppm, respectively); however, this is attributed to contaminants from the environment since similar values were also measured in the room coming probably from the burning wood at the fireplace. Furthermore, according to Middleton and Morice, a level of 6 ppm might be considered as a cut off point for outpatient non smoking individuals [29].

Broadly speaking the origin and distribution of VOCs in humans is mostly unknown. They may be produced in the body (endogenous), or may be absorbed or introduced as contaminants from the environment or foods. In the present study, in order to distinguish between endogenous substances and exogenous contaminants the calculation of the alveolar gradient was performed for each of the substances observed in expired air for over 71% of the volunteers. Thus, substances with positive alveolar gradient indicate that their rate of synthesis in the body is greater than their rate of clearance by metabolism or excretion.

It is assumed that the substances showing positive alveolar gradient (Table 1) are those that derive from one or different metabolic processes that are constantly in progress and may also have a cumulative behavior. Among them acetone showed significantly greater rates of synthesis than other substances, especially after 48 h of fasting. Other ketones identified were 2-pentanone and 2-butanone. Phenol was also among the substances with highest positive alveolar gradient. Phenol originates from foodstuffs and arises from metabolism of aromatic amino acids [30]. Terpenes determined with positive alveolar gradient include di-limonene and 2- β pinene. Di-limonene likely originates from the incense which is frequently used in

the several daily ceremonies in the monastery. A significant number of hydrocarbons (saturated, methylated, unsaturated) have also been identified. These might be correlated with lipid peroxidation as volatile hydrocarbons are considered *in vitro* and *in vivo* markers of oxidative degradation of polyunsaturated fatty acids. Isoprene is formed along the mevalonic pathway of cholesterol synthesis whereas acetaldehyde is probably produced by oxidation of endogenous ethanol [1]. However, it is of interest that pentane was not among them. An explanation might be probable coelution with the extremely high peak of acetone.

On the other hand, ethanol showed the highest negative alveolar gradient (Table 2). This is probably due to contaminants of room air. However, this is in agreement with the literature [19], although ethanol is considered among the endogenous volatile biomarkers. Moreover, a number of substituted benzene derivatives were found. Most of them appeared with a negative alveolar gradient as they are considered exogenous. Furthermore, it is of interest that two chlorinated substances were also measured (dichloromethane, chloromethane). Generally speaking they are considered exogenous; however, some of them (i.e. trichloroethane) were reported in the literature with a positive alveolar gradient [17].

Using analysis of expired air for locating entrapped people seems as a promising search and rescue method, especially if field analytical chemistry and technology is used. Effective urban search and rescue (US&R) operations are among the most promising means to reduce human casualties in earthquakes. The equipment of US&R teams is based on different principles, working either as active or passive systems. Search cameras might record picture, however size, cost and battery duration must be considered. Although electronic listening devices might cover large areas picking up faint noises and vibrations, their range for depth is limited and may have several artifactual interferences. Unconscious victims might be detected by canines which cover large areas in short time and gain access to voids. Disadvantages are their short work period and the great effort and cost to train them [31]. Ultra-sound detection is helpful with the main limitation of inability to survey areas inaccessible to the ultra-sound beam. Consequently, no single tool is sufficiently effective on its own to ensure that a complete search operation has been conducted. VOCs analysis of entrapped people in earthquakes could well be incorporated in audio-visual devices and fill in efficiently where other methods have limitations. The chemical method under study could be very helpful, especially when portable sensitive instruments are used on-line in the field.

However, tracing the dispersion of the odour plume of expired air in the ruins after an earthquake is a complicated task. VOCs are excreted in low concentrations and possible variation of values might appear. Furthermore, in a real situation VOCs distribution is affected by background influences such as dust, particles, household materials and wastes [32]. The physico-chemical properties of the substances of interest should also not be overlooked (i.e. stability, absorption in particles, volatility, water solubility, degradation). Consequently, more research is needed in order to further improve the chemical method used in our study for the early location of individuals in distress.

4. Conclusions

Fasting male monks were sampled as a group of volunteers that resembles the medical status of victims trapped in the ruins of collapsed buildings after an earthquake. The TD-GC-MS analysis carried out in their expired air showed a prominent "positive alveolar gradient" for acetone, phenol, di-limonene, 2-pentanone, isoprene and acetaldehyde. This may imply that they accumulated endogenously during the 3-day fast. Acetone was further identified through a portable sensitive instrument (GC-IMS). The confirmation of the results in further studies might constitute this chemical method a useful complement applicable directly in the field after earthquake disasters.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Abbot of the Holy and Great Monastery of Vatopaidi, Archimandrite Ephraim, and the monastery brotherhood for their hospitality and contribution in this study. It should be noted that the samples were taken in a prescheduled visit of Mr. A. Agapiou in the monastery during the fasting period. The authors acknowledge the General Secretariat of Research and Technology, PENED 2001, for financial support of this work.

References

- [1] W. Miekisch, J.K. Schubert, G.F.E. Noeldge-Schomburg, *Clin. Chim. Acta* 347 (2004) 25.
- [2] S.A. Kharitonov, P.J. Barnes, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163 (2001) 1693.
- [3] M. Phillips, *Sci. Am.* 267 (1992) 74.
- [4] P. Lirk, F. Bodrogi, J. Rieder, *Int. J. Mass Spectrom.* 239 (2004) 221.
- [5] L.C. Van Berkomp, *Alcohol Drugs Driving* 7 (1991) 229.
- [6] M. Phillips, R.N. Cataneo, A.R.C. Cummin, A.J. Gagliardi, K. Gleeson, J. Greenberg, R.A. Maxfield, W.N. Rom, *Chest* 123 (2003) 2115.
- [7] M. Phillips, J.P. Boehmer, R.N. Cataneo, T. Cheema, H.J. Eisen, J.T. Fallon, P.E. Fisher, A. Gass, J. Greenberg, J. Kobashigawa, D. Mancini, B. Rayburn, M.J. Zucker, *Am. J. Cardiol.* 94 (2004) 1593.
- [8] S.M. Studer, J.B. Orens, I. Rosas, J.A. Krishnan, K.A. Cope, S. Yang, J.V. Conte, P.B. Becker, T.H. Risby, *J. Heart Lung Transplant.* 20 (2001) 1158.
- [9] W.-T. Chiu, Y.-T. Shih, H.-Y. Chi, W.-C. Tsai, J. Arnold, K.-H. Hsiung, C.-H. Chiu, W.C. Huang, *Disasters* 26 (2002) 85.
- [10] M. Statheropoulos, E. Sianos, A. Agapiou, A. Georgiadou, A. Pappa, N. Tzamtzis, H. Giotaki, C. Papageorgiou, D. Kolostoumbis, *J. Chromatogr. B* 822 (2005) 112.
- [11] M. Statheropoulos, C. Spiliopoulou, A. Agapiou, *Forensic Sci. Int.* 153 (2005) 147.
- [12] M.P. Kalapos, *Biochim. Biophys. Acta* 1621 (2003) 122.
- [13] H. Lord, Y. Yu, A. Segal, *J. Pawliszyn. Anal. Chem.* 74 (2002) 5650.
- [14] A.W. Jones, *J. Anal. Toxicol.* 11 (1987) 67.
- [15] S.K. Kundu, J.A. Bruzek, R. Nair, A.M. Judilla, *Clin. Chem.* 39 (1993) 87.
- [16] C. Deng, J. Zhang, X. Yu, W. Zhang, X. Zhang, *J. Chromatogr. B* 810 (2004) 269.
- [17] M. Phillips, J. Herrera, S. Krishnan, M. Zain, J. Greenberg, R.N. Cataneo, *J. Chromatogr. B* 729 (1999) 75.
- [18] J.D. Fenske, S.E. Paulson, *J. Air Waste Manage. Assoc.* 49 (1995) 594.
- [19] M. Phillips, *Anal. Biochem.* 247 (1997) 272.
- [20] C. Grote, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 69 (1997) 587.
- [21] A. Amann, G. Poupart, S. Telsler, M. Ledochowski, A. Schmid, S. Mechtcheriakov, *Int. J. Mass Spectrom.* 239 (2004) 227.

- [22] D. Smith, P. Spanel, S. Davies, *J. Appl. Physiol.* 87 (1999) 1584.
- [23] H. Dahake, D. Kleine, P. Hering, M. Murtz, *Appl. Phys. B* 72 (2001) 971.
- [24] V. Ruzsanyi, J.I. Baumbach, S. Sielemann, P. Litterst, M. Westhoff, L. Freitag, *J. Chromatogr. A* 1084 (2005) 145.
- [25] W.H. McClellan, C.L. Vaughn, P.A. Cole, S.N. Sheya, D.J. Wager, T.J. Mott, J.P. Dworzanski, N.S. Arnold, H.L.C. Meuzelaar, *Field Anal. Chem. Technol.* 1 (1996) 109.
- [26] V.A. Skrupskii, *Klin. Lab. Diagn.* 4 (1995) 35.
- [27] M. Phillips, J. Greenberg, *J. Chromatogr. B* 422 (1987) 235.
- [28] T. Qin, X. Xu, T. Polak, V. Pacakova, K. Stulik, L. Jech, *Talanta* 44 (1997) 1683.
- [29] E.T. Middleton, A.H. Morice, *Chest* 117 (2000) 758.
- [30] C.-N. Ong, B.-L. Lee, *J. Chromatogr. B* 660 (1994) 1.
- [31] J. Wong, C. Robinson, Urban search and rescue technology needs: identification of needs, Department of Homeland Security/FEMA, Final report (2004) 1.
- [32] M. Statheropoulos, A. Agapiou, G. Pallis, *Atmos. Environ.* 39 (2005) 4639.



Discriminant Analysis of Volatile Organic Compounds data related to a new location method of entrapped people in collapsed buildings of an earthquake

M. Statheropoulos, K. Miki, A. Agapiou*, A. Georgiadou, S. Karma

National Technical University of Athens (NTUA), School of Chemical Engineering, Sector I, 9 Iroon Polytechniou Street, Athens 157 73, Greece

Received 7 December 2005; received in revised form 21 February 2006; accepted 8 March 2006

Available online 14 March 2006

Abstract

Discriminant Analysis is used as a part of a research, which aims at using expired air analysis for the early location of entrapped people under the ruins of collapsed buildings in an earthquake. This work focuses on the possibility of distinguishing Volatile Organic Compounds (VOCs) in the entrapment area which originate from different sources. Five categories of samples were analyzed by Thermal Desorption-Gas Chromatography–Mass Spectrometry (TD-GC–MS). Expired air samples from healthy humans (Category 1) and fasting people (Category 2) were analyzed for studying the VOCs attributed to entrapped people. Headspace air of urban waste disposal bins (Category 3), headspace air of bags with decaying human bodies (Category 4) and urban air samples (Category 5) were analyzed for studying the VOCs attributed to background sources. Discriminant Rotation, a specific type of Discriminant Analysis was applied on the VOCs concentration matrix of the five categories. Combinations of VOCs that best discriminated each category were determined. Cluster Analysis was used to validate the results of Discriminant Analysis. The advantages and limitations of the method are presented and discussed.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Discriminant Analysis; Expired air analysis; Entrapped people; Collapsed buildings; Earthquakes; Search-and-rescue; VOCs

1. Introduction

Earthquakes may cause massive destruction, high mortality and many casualties without warning. The mission of urban search-and-rescue teams is to locate, reach, medically treat and safely extricate victims trapped within collapsed structures. Human rescuers most commonly use vision, hearing, audio/video devices and sniffer dogs. Current state of the art search equipment includes search cameras, digital thermal cameras and listening devices (sensitive microphones) [1]. However, despite progress in technology, sniffer dogs are most useful in disaster rescue although they take years to train and are inconvenient to transport.

It appears that it is possible to complement the audio/visual devices with field chemical analysis. The idea of using field chemical analysis as a search and locate method of entrapped people under the ruins of collapsed buildings was introduced in a previous study [2]. The concept is to locate these victims by

using field analysis techniques for detecting the Volatile Organic Compounds (VOCs) and inorganic gases that are present in their expired air and other human biological fluids. However, tracing the human VOCs under the ruins of collapsed buildings is a complicated task because of their very low concentration and background interferences. Consequently, it is necessary to determine a group of VOCs that are representative of human presence and to estimate their concentrations in various kinds of entrapment areas as a function of time. In this way an appropriate field analytical technique can be selected for on-line monitoring and tracing of the specified VOCs.

In previous studies, attempts were made to determine both theoretically and experimentally the type and concentration of VOCs attributed to entrapped people. More specifically, an effort was made to theoretically predict the type of compounds (permanent gases and VOCs) expected in various situations of entrapped people. Furthermore, the potentiality of field chemical analysis and technology for locating entrapped people using a four step approach: theory, modeling, experimentation and device development (TMED approach) was also presented [2,3]. In literature, there is a lot of experimental work on VOCs deter-

* Corresponding author. Tel.: +30 210 7723109; fax: +30 210 7723188.
E-mail address: agapiou@central.ntua.gr (A. Agapiou).

mination in the breath of healthy humans [4–6] and extensive work on identifying VOCs in the expired air of people in different medical status [7,8]. However, in the framework of finding out VOCs related to entrapped people, TD-GC–MS was used to analyze the expired air of certain target groups (healthy, fasting) [9,10]. This step produced qualitative and semi-quantitative results for VOCs that could allow the selection of specific compounds as markers (highly representative), or as pattern (limited number of compounds with specific concentrations ratio) of human presence in collapsed buildings. In addition, for estimating the effects of background sources of VOCs, TD-GC–MS experiments were carried out to determine the VOCs evolved from other sources such as urban waste disposal bins [11] and decaying human bodies [12].

In the present work, the results of the TD-GC–MS experiments mostly of the previous studies [9–12] are evaluated by a chemometric technique. More specifically, the concentration of VOCs in the expired air of healthy and fasting people, as well as, in samples of urban air, headspace air of urban waste disposal bins and VOCs evolved from decaying human bodies are analyzed by Discriminant Analysis. Discriminant Analysis has been applied in the past on VOCs measurements for discriminating groups of people, such as people with and without lung cancer [8] or smokers and non-smokers [13]. In this work, the objective is to determine combinations of VOCs that best discriminate between the expired air of living entrapped people and various background sources of VOCs in the entrapment area. The knowledge of these VOCs would be useful in developing field analytical techniques for detecting characteristic compounds related to the presence of entrapped people. In the future, Discriminant Analysis applied on this set of “training” measurements or on a more extended “training” set, can be used as a part of an integrated location device for classifying new measurements acquired during search-and-rescue operations. In this way, the chemical data would be rapidly evaluated and provide with indications of what is hidden behind the rubbles (e.g. living people, dead human bodies).

2. Methodology

2.1. Experimental part

After an earthquake, the air under the ruins of a building may accumulate VOCs, which evolve from various sources, includ-

ing entrapped people, household wastes and decaying human bodies depending on the situation. In the present study, five different categories of air samples were used. Two of the categories were chosen for studying the VOCs that are attributed to human presence. They consist of expired air samples from healthy people (Category 1) and from fasting individuals with no food or water for 63 h (Category 2). Fasting people were included in the study because they partially simulate entrapped people that are helpless for many hours under the debris, without food and water. The three other categories were also selected for VOCs attributed to background sources. They consisted of headspace air samples of urban waste disposal bins (Category 3), headspace air samples of bags with decaying human bodies (Category 4) and urban air samples (Category 5). Urban air samples were consisted of measurements carried out in different weather conditions and included urban and rural samples.

Expired air sampling from healthy and fasting individuals (Categories 1 and 2) was carried out in 5 L Tedlar bags (Alltech). The samples were then transferred to three-layer sorbent tubes spiked with 1 μL of chlorobenzene d-5 as internal standard. Headspace air samples (5 L) from urban waste disposal bins and from bags containing decaying human bodies, as well as, from urban air samples (Categories 3, 4 and 5) were pumped directly in the sorbent tubes. The sorbent tubes were analyzed using an in house made Thermal Desorption unit coupled with a Gas Chromatography–Mass Spectrometry system (HP5890 GC, HP 5972 MSD). Details about the analysis can be found elsewhere [9–12].

The identification of VOCs in the resulting chromatograms was based on the computer library of mass spectra (Wiley 138) and further enhanced by a substance database through “Easy-Id” tool of HP Productivity Chemstation. Semi-quantitative results were obtained by the internal standard method using Relative Response Factors as detailed described in the previous works [9–12]. Table 1 shows the number of air samples analyzed per category, as well as, the number of VOCs identified and selectively quantified in each category. About 140 different VOCs were found overall in the samples examined. The concentrations (nmol L^{-1}) of the VOCs in the various samples were organized in a 28×140 data matrix, the so-called “VOCs’ concentration matrix”. The rows of the matrix represented the 28 air samples, classified in five categories, as shown in Table 1. The columns of the matrix represented the 140 VOCs totally identified in the examined air samples.

Table 1
Categories of air samples examined

	Description	Number of air samples	Number of VOCs identified and quantified
Category 1	Expired air from healthy people	9	63 ^a
Category 2	Expired air from fasting people	7	45 ^b
Category 3	Headspace air of urban waste disposal bins	6	30 ^c
Category 4	Headspace air of bags containing decaying human bodies	2	86 ^d
Category 5	Urban air	4	39

^a VOCs with concentrations over three times higher than a room “blank” sample.

^b VOCs with concentrations over three times higher than a room “blank” sample. Appearance in the samples over 80%.

^c VOCs with concentrations over three times higher than a field “blank” sample. Appearance in the samples over 50%.

^d VOCs with concentrations over three times higher than a field “blank” sample.

2.2. Data Analysis

A specific type of Discriminant Analysis (DA) was used to determine the VOCs that could discriminate between expired air of people (healthy or fasting) and background sources of VOCs such as urban air, household wastes, decaying human bodies. Applying a multivariate technique has certain advantages over a univariate approach (e.g. visual inspection of the categories means per variable, Univariate F-ratio), especially, when more than two categories have to be compared. In these cases, Discriminant Analysis can determine if significant differences exist between sets of categories (e.g. category 1 versus categories 2, 3 and 4) and it can define the sets of variables that best discriminate between the categories [14].

The type of DA applied in this work is called Discriminant Rotation (DR) and is described in details elsewhere [15]. PCA (correlation around the mean) was initially applied on the VOCs concentration matrix as a data reduction technique. The results of PCA are given as: the *scores* matrix **S** (size $s \times f$) and the *loadings* matrix **L** (size $f \times m$) where, f is the number of the significant Principal Component (PCs) with eigenvalues greater than one, s the number of the air samples analyzed and m is the number of the original variables (VOCs concentrations).

The significant PCs were then subjected to DR. The DR calculates the Discriminant Functions (DFs), which are linear combinations of the original variables with maximum outer/inner variance ratios. Each successive DF accounts for successively smaller amount of the outer/inner variance ratio. The outer variance is a measure for the differences between air samples of different categories. The inner variance is a measure of the differences within air samples of the same category. The outer variance matrix **B** (size $f \times f$) is calculated as follows:

$$\mathbf{B} = (\mathbf{S}_{av1} - \mathbf{S}_{av2})^T (\mathbf{S}_{av1} - \mathbf{S}_{av2}) \quad (1)$$

where \mathbf{S}_{av1} (size $c \times f$) is the matrix of the 'categories' means, with each row consisting of the averaged scores of matrix **S** of the particular category, \mathbf{S}_{av2} (size $c \times f$) is the matrix of the 'overall' means, with all the rows consisting of the averaged scores of matrix **S** and c is the number of categories. It should be noted that the scores matrix **S** should be standardized (standard deviation equal to 1 across each column). The *discriminant scores* matrix **DS** (size $s \times d$) and the *discriminant loadings* matrix **DL** (size $d \times m$) are then calculated as follows:

$$\mathbf{DS} = \mathbf{S}\mathbf{E}_2, \quad (2)$$

$$\mathbf{DL} = \mathbf{E}_2^T \mathbf{L}, \quad (3)$$

where \mathbf{E}_2 (size $f \times d$) is the matrix of the eigenvectors of matrix **B** containing only the eigenvectors of the d larger eigenvalues.

The DFs were, finally, rotated to determine the most characteristic VOCs for each category and to get chemically interpretable results. In this work, the direction of rotation was indicated by the so-called Variance Diagram (Vardia). The Vardia shows how strong the correlation between the original variables is, in a two-dimensional DFs space. Variables which are highly correlated, form a maximum in the Vardia. The high correlation of the original variables might indicate a common origin,

such as, a common production mechanism in this particular case.

DA was applied in a part of the original VOCs concentration matrix (size 28×140). This part (size 28×90) contained only the 90 VOCs presented in Table 2 with appearance greater than 50% to at least one category. PONTOS software, an in-house developed multivariate data analysis software package, was used for the application of DA [16].

Table 2

VOCs with appearance greater than 50% to at least one of the five categories examined ranked according to their retention time

	Substance
1	1-Propene
2	Carbon oxide sulfide
3	Methane, chlorodifluoro
4	Methane, chloro
5	Acetaldehyde
6	Pentane
7	Isoprene
8	Ethanol
9	Acetone
10	Carbon disulfide
11	Butane, 2,3-dimethyl
12	Dichloromethane
13	Acetic acid, methyl ester
14	Pentane, 2-methyl
15	Pentane, 3-methyl
16	1-Pentene, 2-methyl
17	1-Hexene
18	Hexane
19	2-Pentene, 4-methyl
20	Butane, 2,2,3-trimethyl
21	Pentane, 2,4-dimethyl
22	2-Butanone
23	Propane, 2-ethoxy-2-methyl
24	Acetic acid, ethyl ester
25	Carbonic acid, dimethyl ester
26	Hexane, 2-methyl
27	Tetrachloromethane
28	Hexane, 3-methyl
29	Benzene
30	1-Pentene, 3-ethyl
31	1-Heptene
32	Heptane
33	Cyclohexane, methyl
34	Hexane, 2,3-dimethyl
35	2-Pentanone
36	3-Pentanone
37	Acetic acid, propyl ester
38	Pentane, 2,3,4-trimethyl
39	Pentane, 2,3,3-trimethyl
40	Heptane, 2-methyl
41	Heptane, 4-methyl
42	Heptane, 3-methyl
43	Disulfide, dimethyl
44	Cyclohexane, 1,4-dimethyl
45	Cyclohexane, 1,3-dimethyl
46	Toluene
47	Octane
48	Heptane, 2,4-dimethyl
49	2-Octene
50	Butanoic acid, ethyl ester
51	2-Hexanone
52	Hexanal

Table 2 (Continued)

	Substance
53	1-Heptene, 5-methyl
54	Octane, 3-methyl
55	Cyclohexane, 1,2,4-trimethyl(1-alpha)
56	Disulfide, methyl ethyl
57	Benzene, ethyl
58	Nonane
59	<i>p</i> -Xylene
60	<i>m</i> -Xylene
61	Cyclohexane, 1-ethyl-4-methyl
62	<i>o</i> -Xylene
63	Styrene
64	Alpha-pinene
65	Cyclohexanone
66	Benzene, 1-ethyl-4-methyl
67	Benzene, propyl
68	Benzene, 1-ethyl-3-methyl
69	Decane
70	2-Beta-pinene
71	Benzene, 1-ethyl-2-methyl
72	Benzene-(1-methylethenyl)
73	Benzene, 1,2,3-trimethyl
74	di-Limonene
75	Benzene, 1,2,4-trimethyl
76	Gamma-terpinene
77	Undecane
78	1-Hexanol, 2-ethyl
79	Phenol
80	Benzene, (2-methyl-1-propenyl)
81	Benzene, 1-ethenyl-4-ethyl
82	Trisulfide, dimethyl
83	1-H-indene, 2,3-dihydro
84	1-H-indene, 2,3-dihydro-2-methyl
85	Ethanone, 1-phenyl
86	Nonanal
87	Benzene, 1,3-diethenyl
88	<i>n</i> -Octyl acetate
89	Decanal
90	Naphthalene

3. Results and discussion

Fig. 1 presents the median concentration profile of the 90 VOCs for the five categories. According to Fig. 1a, the expired air profile of the healthy people includes many non-cyclic hydrocarbons (saturated and unsaturated with five to nine carbon atoms), a few oxygen compounds (acetaldehyde, ethanol, acetone and propane-2-ethoxy-2-methyl), few esters, aromatics, terpenes and a chloro compound. These classes are generally in agreement with the classes found in other studies on expired air of healthy people [6,17,18] with the exception of nitrous and sulfur compounds which have not been detected in this work. Acetone, pentane-2 methyl, hexane, isoprene and 1-pentene-2-methyl appear to have the higher relative concentrations according to Fig. 1a. Acetone and isoprene have already been reported in the literature among the most abundant VOCs in the expired air of healthy people [19,20].

The expired air of fasting people (Fig. 1b) includes many oxygen compounds (alcohols, aldehydes, ketones, esters with up to 10 carbon atoms), many cyclic and non-cyclic hydrocar-

bons (saturated and unsaturated with up to 10 carbon atoms), many aromatics, a few terpenes and a few chloro compounds. Generally, in literature studies exist concerning only determination of specific VOCs of the expired air of fasting people, such as acetone, acetaldehyde, methanol, ethanol and 2-propanol. In this work, only three of these compounds were detected, that is acetone, acetaldehyde and ethanol. According to Fig. 1b, acetone seems to be the most abundant VOC in the expired air of fasting people which is in agreement with other works [21,22].

The headspace air of waste disposal bins (Fig. 1c) includes mainly, alkanes (with five to 10 carbon atoms), aromatics, terpenes, as well as, a few oxygen compounds (acetaldehyde, ethanol and acetic acid ethyl ester), a sulfur compound and naphthalene. These compound classes are in close agreement with those referred in the literature [23], except for the lack of chlorinated hydrocarbons, which have possible sources industrial solvents, soaps, paints and paint removers. Decane and di-limonene seem to be the most abundant VOCs in the headspace air of the waste bins studied in this work (Fig. 1c).

According to Fig. 1d, the main classes of VOCs identified in the headspace air of bags with decaying human bodies are non-cyclic and cyclic hydrocarbons (saturated and unsaturated of three to nine carbon atoms), aromatic hydrocarbons, oxygen compounds (low molecular weight alcohols, aldehydes, ketones and esters), chloro and sulfur compounds. These observations are in close agreement with the results reported by Vass et al. [24]. In our study, disulfide dimethyl and toluene presented the higher relative concentrations (Fig. 1d).

Finally, the urban air VOCs profile (Fig. 1e) includes mainly aromatics, some non-cyclic hydrocarbons (with five to 11 carbon atoms), a few oxygen compounds (acetaldehyde and acetone) and a few terpenes (alpha-pinene, di-limonene). The presence of aromatics, paraffins and olefins in the atmosphere of Athens has also been reported [25]. Vehicle emissions are considered as the main sources of these VOCs.

Application of PCA on the VOCs concentration matrix (size 28 × 90) resulted in 11 PCs with eigenvalues greater than one, accounting for 92% of the total variance. Principal component scores were subjected to DR and gave four Discriminant Functions (DFs) describing a relative variance (outer/inner variance) of 58.2%, 16.1%, 13.9% and 11.7%, respectively.

In Fig. 2, the discriminant score plots are presented. In the DF1/DF2 score plot (Fig. 2a) there is a clear discrimination across DF1 between Category 4 (headspace air from the bags with decaying bodies) and all the other categories. In the DF2/DF3 score plot (Fig. 2b), Category 2 (expired air from fasting people) seems to be related with the negative part of DF2 in DF2/DF3 score plot. In the DF3/DF4 score plot (Fig. 2c), Category 1 (expired air of healthy people) and Category 3 (headspace air of waste disposal bins) seem to be related with the positive parts of the dashed axes A and B, respectively. Finally Category 5 (urban air) seems to be related with the positive part of DF3 in the DF3/DF4 score plot.

In the Vardia plots (Fig. 3), maxima exist in the same directions previously found in the score plots. These maxima indicate groups of highly correlated VOCs that are the most characteristic for each category. More specifically, the maximum across the

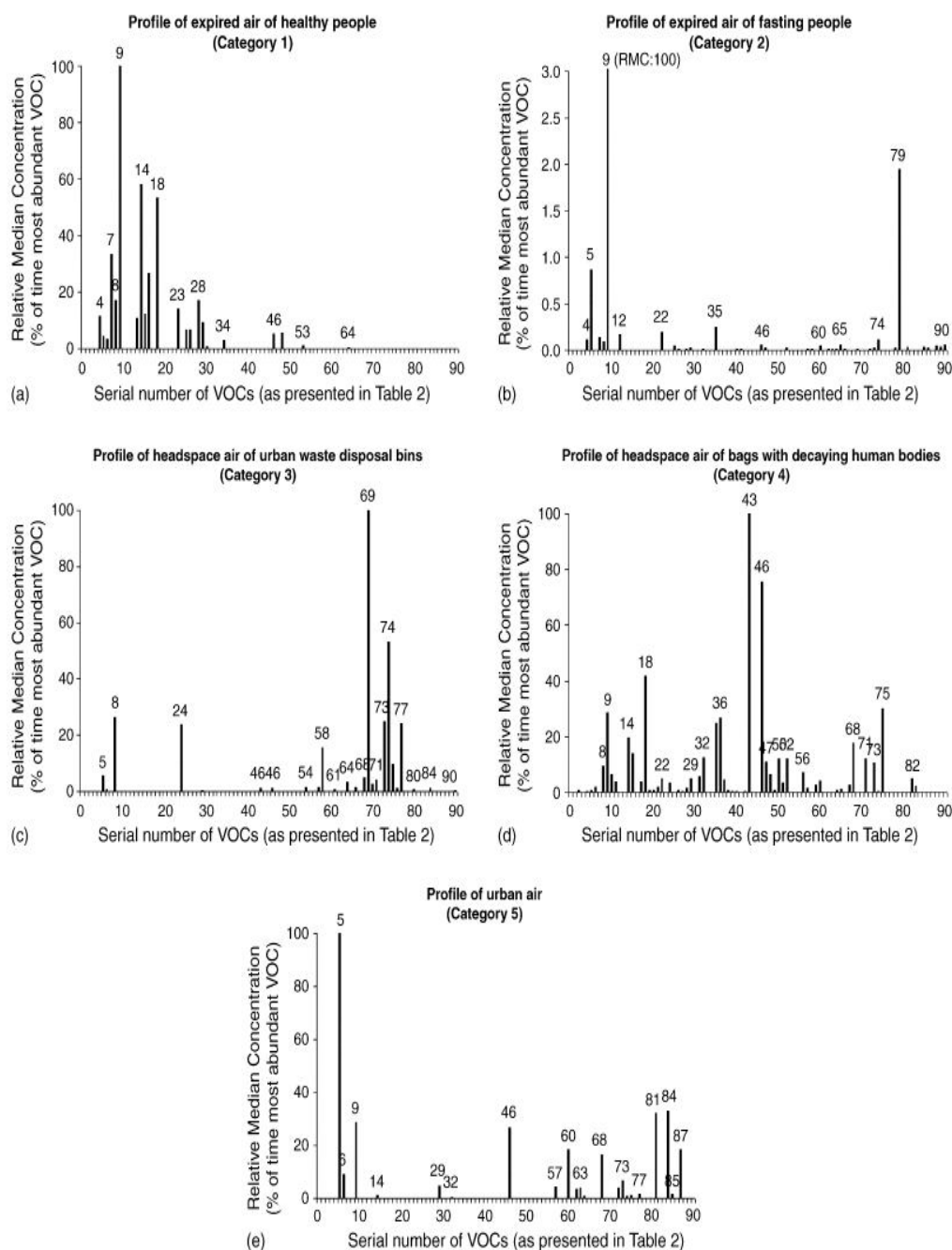


Fig. 1. Relative median concentration profile of (a) expired air of healthy people, (b) expired air of fasting people, (c) headspace air of urban waste disposal bins, (d) headspace air of bags with decaying human bodies and (e) urban air.

direction of “*DF1*” in the *DF1/DF2* Vardia (Fig. 3a) indicate the most characteristic VOCs for Category 4, the maximum across the direction of “*DF2 rotated 180°*” in the *DF2/DF3* Vardia (Fig. 3b) indicate the most characteristic VOCs for Category 2 and so on. In Tables 3–7, the most characteristic VOCs for each category are given. The VOCs are listed in descending order of their loadings on the rotated DFs. The most characteristic VOCs were determined by a “rule of thumb”, as those whose loadings on the rotated DF is greater than 60% of the highest loading.

Table 3 presents the VOCs that best discriminate the expired air of healthy people from all the other sources of VOCs examined in this work. It seems that 19 VOCs, out of the 63 originally detected in the expired air of the healthy group, are the most characteristic of this category. They include mainly branched chain alkanes and alkenes (C_5 , C_6 , C_7), which may be markers of lipid peroxidation of fatty acids as described in Refs. [26,27]. Branched chain alkanes have also been detected with a negative alveolar gradient in other studies of breath samples from healthy subjects and may be attributed to inhalation of indoor pollutants

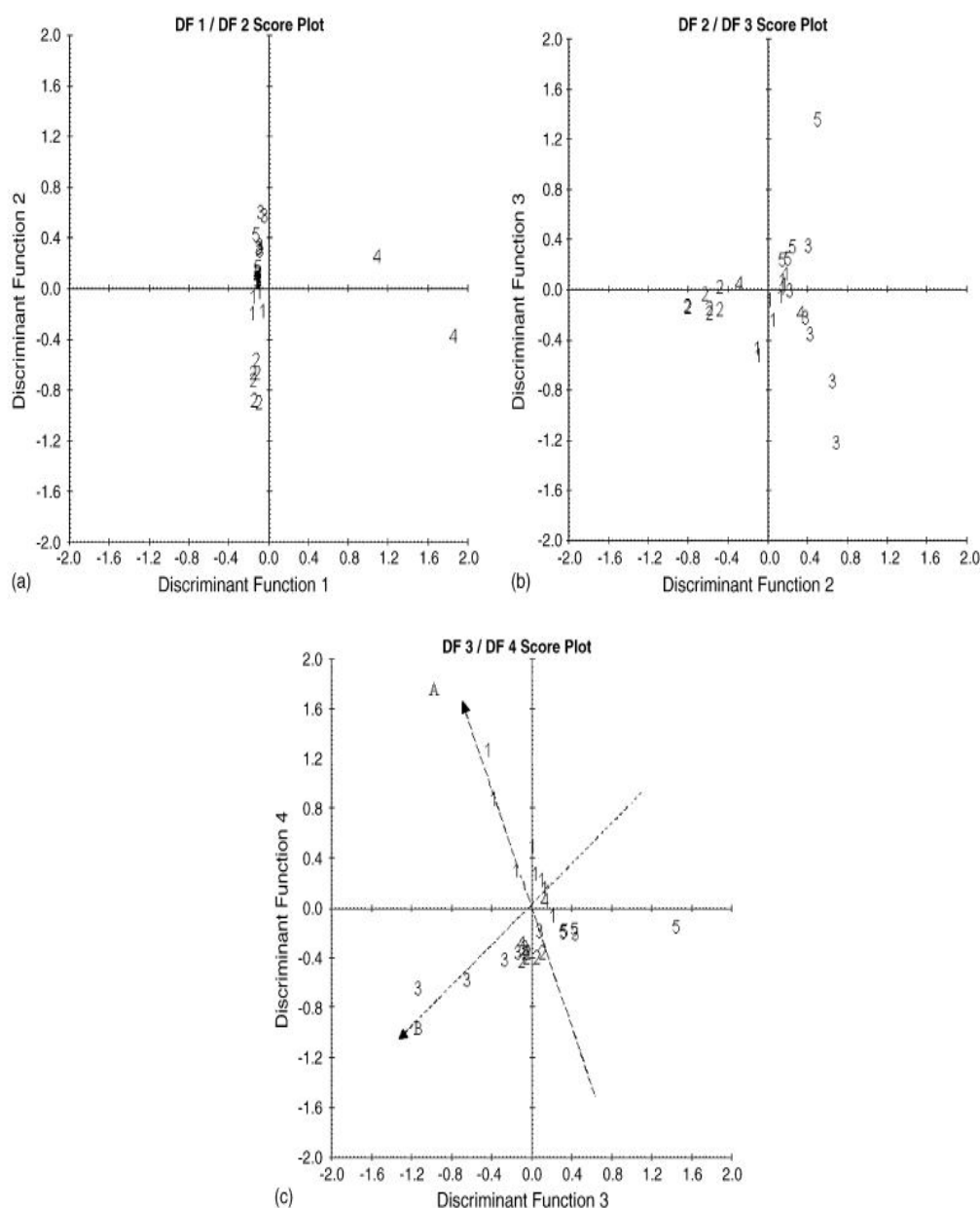


Fig. 2. Score plots in (a) DF1/DF2 space, (b) DF2/DF3 space and (c) DF3/DF4 space.

[6]. However, isoprene is related with the mevalonic acid pathway of cholesterol synthesis [28]. Among the 19 most characteristic VOCs there is also benzene, two esters and a chloro compound. According to Fig. 1a, the most abundant compound among the 19 characteristic VOCs are pentane, 2-methyl, hexane, isoprene, 1-pentene, 2-methyl and hexane, 3-methyl.

Table 4 shows the VOCs that best discriminate the category of fasting people from all the other categories. 10 out of the 45 VOCs, originally, detected in the expired air of the fasting group, seems to be the most characteristic VOCs of this category. They are mainly oxygen compounds (aldehydes, ketones, alcohols) with three to 10 carbon atoms. Acetone, which is the most abundant of the 10 VOCs but not the most characteristic, is one of “ketone bodies” compounds derived from lipid peroxidation and lipolysis (e.g. fasting people, people on diet, patients with

diabetes mellitus) [22]. Aldehydes (e.g. nonanal, decanal) have low relative concentrations in the expired air of fasting people according to Fig. 1b, but they seem to relate strongly with this category. They may be exogenous compounds or they may be products of lipid peroxides [29]. Phenol, has high relative concentration in the expired air of fasting people and seems to relate strongly with this category. It may attribute to foodstuffs or it may arise from the metabolism of aromatic amino acids [30]. Among the 10 VOCs there is also naphthalene, a chloro compound and a cyclic hydrocarbon. Naphthalene may be attributed to the specific environment of the sampling.

Tables 5–7 show the most characteristic VOCs that might be due to background sources. More specifically, Table 5 presents 10 VOCs, out of the 30 VOCs originally identified, that discriminates best the headspace air of waste disposal bins (Category

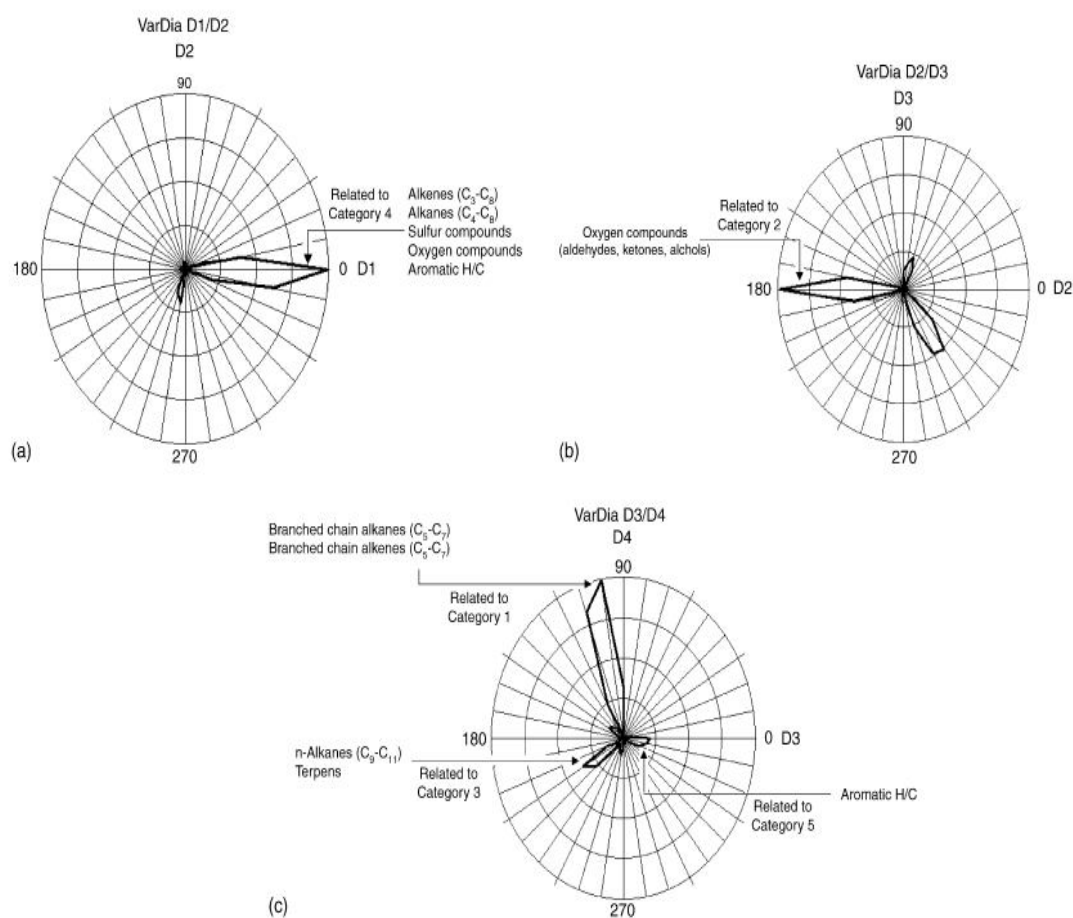


Fig. 3. Vardia plots in (a) DF1/DF2 space, (b) DF2/DF3 space and (c) DF3/DF4 space.

Table 3
VOCs discriminating Category 1 (expired air of healthy people) from the others

S.N. ^a	Compound
28	Hexane, 3-methyl
26	Hexane, 2-methyl
53	<i>1-Heptene, 5-methyl</i>
7	Isoprene
48	Heptane, 2,4-dimethyl
21	Pentane, 2,4-dimethyl
29	Benzene
42	Heptane, 3-methyl
30	<i>1-Pentene, 3-ethyl</i>
14	Pentane, 2-methyl
34	Hexane 2,3 dimethyl
40	Heptane, 2-methyl
25	Carbonic acid, dimethyl ester
41	Heptane, 4-methyl
33	Cyclohexane, methyl
4	Methane, chloro
16	<i>1-Pentene, 2-methyl</i>
18	Hexane
13	<i>Acetic acid, methyl ester</i>

VOCs are listed in descending order of their loadings on the direction of "DF3 rotated 100°" in the DF3/DF4 Vardia. Compounds in italics indicate VOCs that were identified exclusively in this category.

^a Serial number as appeared in Table 2.

3) from all the other air samples examined. The 10 VOCs include *n*-alkanes (C₉, C₁₀, C₁₁), terpenes, aromatic hydrocarbons and an ester. Aliphatic and aromatic hydrocarbons and the ester are probably derived from packaging materials or their labels (printing inks) [31]. All of them have high/medium relative concentrations in the examined samples as presented in Fig. 1c. Terpenes are derived from the biogenic emissions due to volatilization of compound contained in plant waste (trees,

Table 4
VOCs discriminating Category 2 (expired air of fasting people) from the others

S.N. ^a	Compound
86	<i>Nonanal</i>
79	<i>Phenol</i>
89	<i>Decanal</i>
88	<i>n-Octyl acetate</i>
12	<i>Dichloromethane</i>
85	Ethanone, 1-phenyl
78	<i>1-Hexanol, 2-ethyl</i>
90	Naphthalene
9	Acetone
45	<i>Cyclohexane, 1,3-dimethyl</i>

VOCs are listed in descending order of their loadings on the direction of "DF2 rotated 180°" in the DF2/DF3 space. Compounds in italics indicate VOCs that were identified exclusively in this category.

^a Serial number as appeared in Table 2.

Table 5
VOCs discriminating Category 3 (headspace air of urban waste disposal bins) from the others

S.N. ^a	Compound
58	Nonane
61	Cyclohexane, 1-ethyl-4-methyl
73	Benzene 1,2,3-trimethyl
70	2-Beta-pinene
76	<i>Gamma-terpinene</i>
69	Decane
66	Benzene, 1-ethyl-4-methyl
24	Acetic acid, ethyl ester
74	di-Limonene
77	Undecane

VOCs are listed in descending order of their loadings on the direction of “DF3 rotated 210°” in the DF3/DF4 Vardia. Compounds in italics indicate VOCs that were identified exclusively in this category.

^a Serial number as appeared in Table 2.

Table 6
VOCs discriminating Category 4 (headspace air of bags with decaying human bodies) from the others

S.N. ^a	Compound
1	<i>1-Propene</i>
17	<i>1-Hexene</i>
49	<i>2-Octene</i>
38	<i>Pentane, 2,3,4-trimethyl</i>
55	<i>Cyclohexane, 1,2,4-trimethyl (1-alpha)</i>
10	<i>Carbon disulfide</i>
43	Disulfide, dimethyl
20	<i>Butane, 2,2,3-trimethyl</i>
37	<i>Acetic acid, propyl ester</i>
31	<i>1-Heptene</i>
32	Heptane
19	<i>2-Pentene, 4-methyl</i>
83	<i>1-H-Indene, 2,3-dihydro</i>
2	<i>Carbon oxide sulfide</i>
56	<i>Disulfide, methyl ethyl</i>
39	<i>Pentane, 2,3,3-trimethyl</i>
35	2-Pentanone
51	2-Hexanone
59	<i>p-Xylene</i>
67	Benzene, propyl
82	<i>Trisulfide, dimethyl</i>
36	<i>3-Pentanone</i>
71	Benzene, 1-ethyl-2-methyl
11	<i>Butane, 2,3-dimethyl</i>
68	Benzene, 1-ethyl-3-methyl
50	<i>Butanoic acid, ethyl ester</i>
52	Hexanal
3	<i>Methane, chlorodifluoro</i>
27	<i>Tetrachloro, methane</i>
22	2-Butanone
47	Octane
46	Toluene
75	Benzene 1,2,4-trimethyl
44	Cyclohexane 1,4-dimethyl

VOCs are listed in descending order of their loadings on the direction of “DF1 rotated 0°” in the DF1/DF2 Vardia. Compounds in italics indicate VOCs that were identified exclusively in this category.

^a Serial number as appeared in Table 2.

Table 7
VOCs discriminating Category 5 (urban air) from the others

S.N. ^a	Compound
81	Benzene, 1-ethenyl-3-methyl
63	Styrene
87	<i>Benzene, 1,3-diethenyl</i>
72	Benzene-(1-methylethenyl)
62	<i>o-Xylene</i>
84	1-H-Indene, 2,3-dihydro-2-methyl

VOCs are listed in descending order of their loadings on the direction of “DF3 rotated 0°” in the DF3/DF4 Vardia. Compounds in italics indicate VOCs that was identified exclusively in this category.

^a Serial number as appeared in Table 2.

leaves, shrubs, wasted vegetables) or from direct emissions from fragrant household detergents and air fresheners [23]. According to Fig. 1c, di-limonene has high relative concentration in the examined samples, while 2-beta-pinene and gamma-terpinene have low concentrations.

In Table 6, there are 34 of the 86 VOCs originally identified in the headspace air of bags with decaying human bodies (Category 4) that were selected as the most characteristic VOCs of this category. The 34 VOCs include alkenes (C₃–C₈), alkanes (normal, branched chain and cyclic, C₄–C₈), sulfur compounds, oxygen compounds, aromatic hydrocarbons and chloro compounds. Alkanes, alkenes, and chlorinated hydrocarbons seem to be in relatively low concentrations in the air samples (Fig. 1d). Similar alkanes have also been identified in the breath of patients with lung cancer [8]; they may be related to increased oxygen free-radical activity. Oxygen free-radicals degrade cell membranes by lipid peroxidation and convert these polyunsaturated fatty acids to volatile alkanes. Sulfur compounds, aromatics and carbonyl compounds have relatively medium to high concentrations in the air samples (dimethyl disulfide, toluene, benzene 1,2,4-trimethyl, benzene 1-ethyl-2-methyl, 2-pentanone and 3-pentanone). Similar aromatic hydrocarbons have also been identified in the breath of patients with lung cancer [8]. Volatile sulfur compounds are commonly associated with anaerobic decomposition of organic matter and are well known for their characteristic strong disagreeable and permeable odors. Dimethyl disulfide, the most abundant VOC identified in the samples, is probably, a byproduct of protein breakdown by bacteria and usually is associated with the early decompositional process.

Finally, Table 7 presents six of the 39 VOCs originally identified in the urban air samples. These compounds were selected as the most characteristic of this category. They are mainly aromatic hydrocarbons, attributed possibly to the internal combustion engines of vehicles.

Cluster Analysis (CA) was applied on the autoscaled data matrix of the VOCs concentrations (size 28 × 90) to validate the results of DA. More specifically, CA was performed on the variables (VOCs) in order to investigate if the groups of VOCs presented in Tables 3–7 (resulted from DA) could be established, as well, by this chemometric technique. The nearest neighbor (single-linkage) method was used for computing distances between two clusters. Euclidean distance was used as

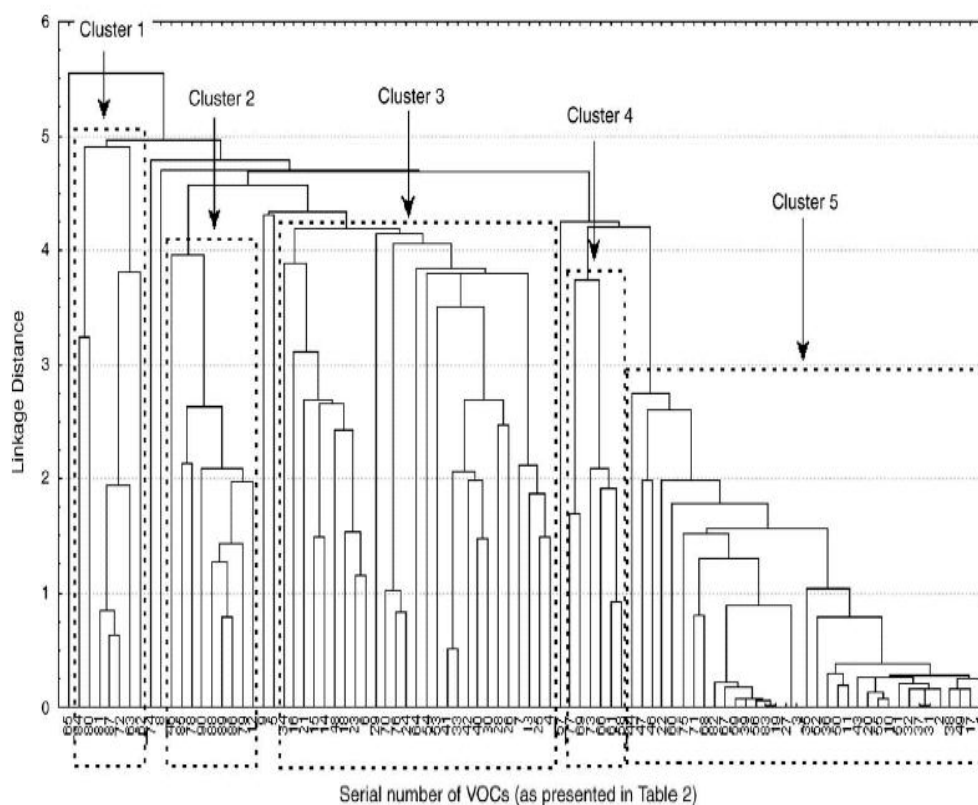


Fig. 4. Dendrogram produced by Cluster Analysis of variables (VOCs) using the single-linkage method. Dashed line rectangulars show the identified clusters.

a measure of similarity. CA was performed using STATISTICA for Windows 5.0 (StatSoft Inc.).

Fig. 4, presents the dendrogram obtained when clustering variables (VOCs). It is observed that the VOCs presented in Tables 3–7 establish five different clusters, shown in dashed line rectangulars, in the dendrogram. Cluster 1 of the dendrogram, includes the VOCs with serial numbers (as presented in Table 2) 84, 81, 87, 72, 63 and 62. These are the same as the VOCs presented in Table 7 that discriminate Category 5 (urban air) from the others, according to DA. Moreover, Cluster 1 includes VOC with serial number 80 (Benzene, 2-methyl-1-propenyl) which would be the first additional VOC to be selected by DA if the loading threshold was less than the one used (that is, less than 60% of the highest loading). Cluster 2 includes VOCs with serial numbers 45, 85, 78, 90, 88, 89, 86, 79 and 12. The same VOCs were also selected by DA, as presented in Table 4, for discriminating Category 2 (expired air of fasting people) from the others. However, Cluster 2 does not include VOC 9 (acetone), which was one of the VOCs selected by DA. According to CA, VOC 9 is better related to Cluster 3, which includes the VOCs that discriminate the expired air of healthy people (Category 1) from the others. Nevertheless, it still seems that acetone could be one of the VOCs that discriminate expired air of live people (healthy or fasting) from air attributed to background sources. Cluster 3 of the dendrogram includes all the VOCs that, according to DA, discriminate Category 1 (healthy people) from the other categories. That is, VOCs with serial numbers 34, 16, 21, 14, 48, 18, 29, 53, 41, 33, 42, 40, 30, 28, 26, 7, 13, 25 and 4 which are also shown in Table 3. Moreover, Cluster 3 includes VOCs 15, 23,

6, 64, 54, 70, 76 and 24. VOCs 15, 23, 6, 64 and 54 would have also been selected by DA if the threshold was less than 60% of the highest loading. However, the inclusion of VOCs 70, 76 and 24 in Cluster 3 is not in accordance with the results of DA. The latter suggests those VOCs for discriminating Category 3 from the others, as shown in Table 5. Cluster 4 of the dendrogram consists of VOCs with serial numbers 77, 69, 73, 66, 61 and 58. These VOCs were also selected by DA, as shown in Table 5, for discriminating Category 3 (headspace air of urban waste disposal bins) from the others. However, Table 5 includes additionally VOCs 70, 76, 24 and 74, which were not grouped by CA. Cluster 5 includes VOCs 44, 47, 46, 22, 60, 75, 71, 68, 82, 67, 59, 39, 56, 83, 19, 27, 3, 35, 52, 36, 50, 11, 43, 20, 55, 10, 51, 32, 37, 31, 2, 38, 49, 17 and 1. DA, as shown in Table 6, also selected these VOCs for discriminating Category 4 (headspace air of bags with decaying human bodies) from the others. VOC 60 is not shown in Table 6, because of the selected threshold (60% of the highest loading). Conclusively, CA validates the results of DA except for the VOCs presented in Table 5, which are partially validated.

4. Conclusions

Summarizing, Discriminant Rotation applied in this study made it possible to discriminate among air samples of healthy, fasting individuals, household wastes, decaying bodies and urban air. These air samples can be correlated with the different status of entrapped people (e.g. under the ruins of collapsed building in an earthquake), as well as, with the chemical

background of the entrapment. The air samples represented the VOCs concentrations they included. It appears that less than one-third of the VOCs originally determined in each category are necessary for discriminating among the different samples. Discriminant Rotation has prepared a “training set” which allows for fast classification of any new measurement.

Cluster Analysis validated the majority of results of these studies. However, the results should be interpreted in a careful way, i.e. a larger number of subjects should be examined for verifying that the results are a solid solution. Nevertheless, they provide an initial approach in coping with a complicated problem and in relation to the difficulty of obtaining big number of measurements. Analyzing more samples, as well as, including more categories (e.g. expired air from stressed or multi-injured individuals and other background interferences) is required.

Acknowledgement

The authors acknowledge the General Secretariat of Research and Technology (Greece), PENED 2001, for financially supporting this work.

References

- [1] W.-T. Chiu, Y.-T. Shih, H.-Y. Chi, W.-C. Tsai, J. Arnold, K.-H. Hsiung, C.-H. Chiu, W.C. Huang, *Disasters* 26 (2002) 85.
- [2] M. Statheropoulos, A. Agapiou, *J. Process Anal. Chem.*, in press.
- [3] M. Statheropoulos, A. Agapiou, Field chemical analysis portable device for locating entrapped people in collapsed buildings after an earthquake, in: *Proceedings of the 13th International Conference On-Site analysis*, Arlington, Virginia, Washington, DC, USA, 2005.
- [4] L. Pauling, A.B. Robinson, R. Teranishi, P. Cary, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68 (1971) 2374.
- [5] M. Phillips, *Anal. Biochem.* 247 (1997) 272.
- [6] M. Phillips, J. Herera, S. Krishnan, M. Zain, J. Greenberg, R.N. Cataneo, *J. Chromatogr. B* 729 (1999) 75.
- [7] H.J. O’Neil, S.M. Gordon, M.H. O’Neill, R.D. Gibbons, J.P. Szidon, *Clin. Chem.* 34 (1988) 1613.
- [8] M. Phillips, K. Gleeson, J. Michael, B. Hughes, J. Greenberg, R.N. Cataneo, L. Baker, W.P. McVay, *Lancet* 353 (1999) 1930.
- [9] M. Statheropoulos, E. Sianos, A. Agapiou, A. Georgiadou, A. Pappa, N. Tzamtzis, H. Giotaki, C. Papageorgiou, D. Kolostoumbis, *J. Chromatogr. B* 822 (2005) 112.
- [10] M. Statheropoulos, A. Agapiou, A. Georgiadou, *J. Chromatogr. B* 832 (2006) 274.
- [11] M. Statheropoulos, A. Agapiou, G. Pallis, *Atmos. Environ.* 39 (2005) 4639.
- [12] M. Statheropoulos, C. Spiliopoulou, A. Agapiou, *Forensic Sci. Int.* 153 (2005) 147.
- [13] S.M. Gordon, *J. Chromatogr.* 511 (1990) 291.
- [14] J.F. Hair, R.E. Anderson, R.L. Tatham, W.C. Black, *Multivariate Data Analysis*, 5th ed., Prentice Hall, New Jersey, 1998, p. 297.
- [15] W. Windig, H.L.C. Meuzelaar, in: H.L.C. Meuzelaar, T.L. Isenhour (Eds.), *Computer-Enhanced Analytical Spectroscopy*, vol. 1, Plenum Press, New York, 1987, p. 67.
- [16] M. Statheropoulos, H.L.C. Meuzelaar, N. Vassiliades, *Multivariate Data Analysis Techniques for Spectroscopic Data: The PONTOS Case*, version 1.2. Center for MicroAnalysis and Reaction Chemistry, University of Utah, USA, 1996.
- [17] B. Krotoszynski, G. Gabriel, H. O’Neill, M.P.A. Claudio, *J. Chromatogr. Sci.* 15 (1977) 239.
- [18] M. Phillips, J. Greenberg, *Clin. Chem.* 38 (1992) 60.
- [19] H. Lord, Y. Yu, A. Segal, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5650.
- [20] J.M. Sanchez, R.D. Sacks, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2231.
- [21] D. Smith, *The Am. Physiol. Soc.* (1999) 1584.
- [22] H.E. Lebovitz, *Lancet* 345 (1995) 767.
- [23] S.C. Zou, S.C. Lee, C.Y. Chan, K.F. Ho, X.M. Wang, L.Y. Chan, Z.X. Zhang, *Chemosphere* 51 (2003) 1015.
- [24] A.A. Vass, R.R. Smith, C.V. Thompson, M.N. Burnett, D.A. Wolf, J.A. Syntelien, N. Dulgerian, B.A. Eckenrode, *J. Forensic Sci.* 49 (2004) 1.
- [25] N. Moschonas, S. Glavas, *Atmos. Environ.* 30 (1996) 2769.
- [26] M. Phillips, R.N. Cataneo, J. Greenberg, R. Grodman, R. Gunawardena, A. Naidu, *Eur. Resp. J.* 21 (2003) 48.
- [27] M. Phillips, R.N. Cataneo, J. Greenberg, R. Gunawardena, F. Rahbari-Oskoui, *Clin. Chim. Acta* 328 (2003) 83.
- [28] B.G. Stone, T.J. Besse, W.C. Duane, C.D. Evans, E.G. DeMaster, *Lipids* 28 (1993) 705.
- [29] L. De Zwart, J. Meerman, *Free Radical Biol. Med.* 26 (1999) 202.
- [30] C.-N. Ong, B.-L. Lee, *J. Chromatogr. B* 660 (1994) 1.
- [31] K. Wilkins, *Ann. Agric. Environ. Med.* 4 (1997) 87.

Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Μέτρου 8.3 του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα Γ' Κοινοτικό Πλαίσιο Στήριξης και συγχρηματοδοτείται κατά 75% της Δημόσιας Δαπάνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση- Ευρωπαϊκό Κοινοτικό Ταμείο, 25% της Δημόσιας Δαπάνης από το Ελληνικό Δημόσιο-Υπουργείο Ανάπτυξης-Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας και από τον Ιδιωτικό Τομέα.