

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**Ανάπτυξη Μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας
σε Συνδυασμό με Διαδοχική Φασματομετρία Μαζών
για τον Προσδιορισμό των Αντιδιαβρωτικών Ουσιών Τύπου
Βενζοτριαζολών σε Αστικά Λύματα κι Εμπορικά Προϊόντα.**

Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

ΚΑΡΓΑΚΗ ΣΟΦΙΑ

Ηράκλειο, Μάιος 2006

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
ENVIRONMENTAL CHEMICAL PROCESSES LABORATORY
ENVIRONMENTAL SCIENCE AND ENGINEERING

**Determination of Benzotriazole Corrosion Inhibitors from
Aqueous Environmental Samples and Commercial Products
by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem
Mass Spectrometry**

Master of Science Degree (M.Sc.)

KARGAKI SOPHIA

Heraklion, May 2006

*Στους γονείς μου,
Κατερίνα και Κωνσταντίνο*

Επιβλέπων καθηγητής

Ευριπίδης Στεφάνου

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής

Ευριπίδης Στεφάνου

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Νικόλαος Μιχαλόπουλος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Σπυρίδων Περγαντής

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Χημικών Διεργασιών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Επιστήμες και Μηχανική Περιβάλλοντος», υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Ευριπίδη Στεφάνου στον οποίο θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές και ειλικρινείς ευχαριστίες μου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου την μελέτη αυτή. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις πολύτιμες συμβουλές και την συνεχή καθοδήγηση που σε όλη την διάρκεια της έρευνας δίνοντας μου έτσι την δυνατότητα να διευρύνω τις γνώσεις μου στον τομέα των σύγχρονων μεθόδων ανάλυσης και τεχνολογίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους καθηγητές κ. Ν. Μιχαλόπουλο και κ. Σπ. Περγαντή για τις χρήσιμες υποδείξεις τους καθώς και για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική μου επιτροπή. Ευχαριστώ επίσης όλους τους καθηγητές του προγράμματος «Επιστήμες και Μηχανική Περιβάλλοντος» για τις γνώσεις που μου παρείχαν στον τομέα των Περιβαλλοντικών Επιστημών, κατά την διάρκεια των σπουδών μου στο πρόγραμμα αυτό.

Ευχαριστώ τον Δρ. Αντώνη Κουβαράκη για την συνδρομή του και την προθυμία του στην εκμάθηση αναλυτικών τεχνικών κατά της διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής. Βαθύτατα θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Volker Nischwitz γιατί με τις πολύτιμες γνώσεις, τις εύστοχες υποδείξεις αλλά και την εργαστηριακή εμπειρία την οποία διαθέτει συνέβαλε σημαντικά στην αντιμετώπιση ποικίλων δυσκολιών κατά την εκπόνηση της εργασίας αυτής. Ευχαριστώ επίσης όλους τους συνάδελφους του εργαστηρίου αλλά και των σχετικών εργαστηρίων για το κλίμα φιλίας και συνεργασίας που αναπτύξαμε.

Πολύτιμη στάθηκε και η βοήθεια του προσωπικού της Μονάδας Βιολογικής Επεξεργασίας Λυμάτων του Ηρακλείου την περίοδο των δειγματοληψιών στον χώρο αυτό, και ιδιαίτερα του διευθυντή κ. Μπάμπη Παπαδογιάννη ο οποίος συνέβαλε και στην οργάνωση των δειγματοληψιών αυτών.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, για την ηθική στήριξη, την αμέριστη ενθάρρυνση και πολύπλευρη συμπαράσταση τους σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου. Τους αφιερώνω λοιπόν την μελέτη αυτή, πιστεύοντας ότι αποτελεί ελάχιστο δείγμα της ευγνωμοσύνης μου για όλα όσα έχουν κάνει εκείνοι για μένα.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια η ανησυχία για την ποιότητα του ύδατος έχει εστιαστεί σε διαφορετικούς ρυπαντές. Εκτός από τους κλασσικούς ρυπαντές (π.χ. πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα, πολυχλωριωμένα διφαινύλια) έχει προκύψει ευρεία γκάμα πιθανών νέων ρυπαντικών παραγόντων, σε μικρές συγκεντρώσεις (μικρορυπαντές), όπως: οι φαρμακευτικές ουσίες, οι βιοκτόνες ουσίες, τα προσθετικά της βενζίνης, οι επιβραδυντές ανάφλεξης και οι ανασταλτικοί παράγοντες διάβρωσης. Στην τελευταία κατηγορία συγκαταλέγονται οι ενώσεις τις οποίες πραγματεύεται η παρούσα εργασία και οι οποίες ανήκουν στην ομάδα των βενζοτριαζολών.

Η βενζοτριαζόλη, η 4 (ή 5) μεθυλοβενζοτριαζόλη ή τολυλτριαζόλη και η 5,6-διμέθυλοβενζοτριαζόλη χρησιμοποιούνται ευρέως σαν ανασταλτικοί παράγοντες διάβρωσης (π.χ. σε αντιψυκτικές ουσίες αυτοκινήτων και σε αντιπηκτικά). Παράλληλα περιέχονται στα απορρυπαντικά πλυντηρίων πιάτων παρέχοντας έτσι προστασία κατά της οξειδωσης στα μεταλλικά μέρη της συσκευής. Ιδιαίτερα ευρεία είναι η χρήση τους σε αντιψυκτικά υγρά αεροσκαφών και αεροδιαδρόμων (ADFs: Aircraft Deicing Fluids), τα οποία χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό σε χώρες με έντονα φαινόμενα χιονόπτωσης για να αποφευχθεί η δημιουργία πάγου τόσο στα αεροσκάφη όσο και στις πίστες των αεροδρομίων. Οι ενώσεις αυτές προστίθενται στα αντιψυκτικά υγρά για να μειώσουν έτσι και τον κίνδυνο ανάφλεξης από την οξείδωση μεταλλικών τμημάτων. Τέλος, γίνεται αναφορά για παρουσία τους και σε μυκητοκτόνες ουσίες.

Οι ενώσεις αυτές είναι ευδιάλυτες στο νερό (με διαλυτότητα 5, 3 και 1 g/L αντίστοιχα) αρκετά σταθερές στην βιοαποικοδόμηση και εμφανίζουν υψηλή υδροφιλικότητα. Επομένως η παρουσία των πρόσθετων αυτών ουσιών στα υγρά απόβλητα κι ενδεχομένως και στα υπόγεια και επιφανειακά νερά είναι αρκετά πιθανή. Για τον λόγο αυτό αναπτύχθηκε μια αναλυτική μέθοδος για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων αυτών. Η συζευγμένη υγρή χρωματογραφία (LC) με τη διαδοχική φασματομετρία μαζών (MS/MS) είναι η τεχνική εκείνη η οποία συνέβαλε στον ακριβή προσδιορισμό των ενώσεων αυτών σε πολύπλοκα δείγματα όπως είναι τα απόβλητα ύδατα και τα δείγματα ιλύος. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε σε δείγματα τα οποία προέρχονται από τον σταθμό βιολογικής επεξεργασίας

αποβλήτων τόσο στην υγρή όσο και στην σωματιδιακή φάση καθώς και σε εμπορικά προϊόντα (απορρυπαντικό πλυντηρίου πιάτων, αντιπηκτικό αυτοκινήτων).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι είναι λίγες οι μελέτες εκείνες οι οποίες αφορούν την περιβαλλοντική έκθεση σε τέτοιου είδους ενώσεις. Έτσι ενώ υπάρχει οδηγία από την Ευρωπαϊκή Ένωση η οποία θέτει τους αναγκαίους νομικούς περιορισμούς σε χημικές ουσίες όπως είναι οι βιοκτόνες ουσίες, για τους ανασταλτικούς παράγοντες διάβρωσης δεν υπάρχει αντίστοιχη ρύθμιση. Η έλλειψη στοιχείων για τις προαναφερθείσες ενώσεις είναι εκείνη η οποία συμβάλει στην έλλειψη αξιολόγησης και εφαρμογής νομικών μέτρων για τις ενώσεις αυτές από την Ευρωπαϊκή Ένωση.

Abstract

The environmental concerns on water quality and safety have changed dramatically over the past few years. Beside the classic pollutants (e.g. PAHs, organochlorine pesticides, PCBs) a long list of potential novel contaminants emerged (ECs): pharmaceuticals, biocides, gasoline additives, flame retardants and corrosion inhibitors. In the last category is included the team of benzotriazoles.

Benzotriazole, tolyltriazole and 5,6-dimethyl-1H-benzotriazole are widely used as inhibitors of corrosion (e.g. in antifreezes and anticoagulants). At the same time, they are contained in the detergents of dish-washers to provide protection of the metal parts of appliances towards oxidation. Particularly wide is their use in the antifreeze liquids of airplanes and air corridors (ADFs: Aircraft Deicing Fluids), which are used in countries with cold climates in order to avoid the creation of ice at the airplanes and at the airports. Finally, there are reports which refer the presence of benzotriazoles in fungicide substances.

Benzotriazole, tolyltriazole and 5,6-dimethyl-1H-benzotriazole are well soluble in water (solubility: 5, 3 and 1 g/L, respectively), relatively persistent to biodegradation and they present high hydrophilicity. Consequently, it must be expected that these additives occur in wastewaters and eventually also in ambient waters. For this reason an analytical method for the qualitative and quantitative determination of these substances was developed. This method comprises liquid chromatography (LC) with tandem mass spectrometry (MS/MS). This technique contributed to the reliable determination of these substances in complicated samples such as wastewater and sludge samples. The above analytical method was applied to samples which are taken from a wastewater treatment plant and as well as to commercial products (detergent of dish-washer, antifreeze of cars), to determine their content in benzotriazoles.

There are few studies which concern the environmental exposure to polar ECs. While the European Union Biocidal Product Directive will put legal constraints on the chemicals used as biocidal products, anticorrosive additives will not be regulated at all. Exposure assessment in Europe is hampered by the lack of monitoring data for the above mentioned compounds.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	17
1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	17
1.2. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΤΡΙΑΖΟΛΩΝ	18
1.3. ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΤΡΙΑΖΟΛΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΨΥΚΤΙΚΑ ΥΓΡΑ ΑΕΡΟΣΚΑΦΩΝ	19
1.4. ΑΝΤΙΔΙΑΒΡΩΤΙΚΗ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ	20
1.5. ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΤΡΙΑΖΟΛΩΝ	24
1.6. ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΕΚΘΕΣΗ ΣΤΙΣ ΒΕΝΖΟΤΡΙΑΖΟΛΕΣ	24
1.7. ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΒΕΝΖΟΤΡΙΑΖΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΟΛΥΛΤΡΙΑΖΟΛΗΣ	25
1.7.1. Οικοτοξικότητα της βενζοτριαζόλης και της τολυλτριαζόλης.....	26
1.7.2. Διαθέσιμα στοιχεία τοξικότητας των τριαζολών σε θηλαστικά	28
1.8. ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΤΡΙΑΖΟΛΩΝ ΣΤΗΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΗ ΦΑΣΗ	29
1.8.1. Κατηγορίες προσρόφησης.....	30
1.8.2. Ισόθερμα προσρόφησης.....	31
1.9. ΔΕΙΚΤΗΣ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ	33
1.10. ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΤΡΙΑΖΟΛΩΝ.....	33
1.11. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΛΥΜΑΤΩΝ ΣΤΟΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΣΤΑΘΜΟ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ	35
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	40
2.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	40
2.1.1. Εκχύλιση στερεάς φάσης.....	40
2.1.2. Εκχύλιση με συσκευή Soxhlet.....	43
2.1.3. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης.....	45
2.1.4. Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης – Ηλεκτροφεκασμού – Διαδοχικής Φασματομετρίας Μάζων.....	48
Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης.....	48
Τεχνική Ηλεκτροφεκασμού.....	50
Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας.....	52
2.2. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ	56
2.3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	58
2.3.1. Αντιδραστήρια	58
2.3.2. Δείγματα.....	58
2.3.3. Επεξεργασία δειγμάτων σταθμού βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων.....	59
2.3.4. Επεξεργασία εμπορικών δειγμάτων.....	64
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	66
3.1. ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	66
3.1.1. Μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας με χρήση ανιχνευτή DAD	66
3.1.2. Ηλεκτροφεκασμός.....	70
3.1.3. Τεχνική Σάρωσης με Μελέτη Χαρακτηριστικών Αντιδράσεων	71
3.1.4. Διαδικασία επιλογής θυγατρικών ιόντων για την παρακολούθηση τους με την μέθοδο SRM (Selected Reaction Monitoring)	73
3.1.5. Προσδιορισμός βέλτιστης ενέργειας πρόσκρουσης.....	77
3.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ, ΟΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ, ΟΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ, ΚΑΙ ΟΡΙΩΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	82
3.2.1. Υπολογισμός Συντελεστών Ανάκτησης	82
3.2.2. Έλεγχος της επαναληψιμότητας για την τεχνική HPLC.....	87
3.2.3. Υπολογισμός του ορίου ανίχνευσης για το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης	88
3.2.4. Υπολογισμός ορίου ανίχνευσης της μεθόδου	88
3.2.5. Προσδιορισμός ορίου ανίχνευσης των τριαζολών με χρήση του συστήματος υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με την φασματομετρία μάζας	89

3.2.6. Προσδιορισμός ορίου ανίχνευσης της μεθόδου με χρήση του συστήματος υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με διαδοχική φασματομετρία μάζας	91
3.2.7. Προσδιορισμός Ορίου Ποσοτικοποίησης.....	91
3.3. ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΓΝΩΣΤΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ ΜΗΤΡΑΣ (MATRIX EFFECT)	93
3.4. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΡΙΑΖΟΛΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥ ΣΤΑΘΜΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΛΥΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΕ ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ..	96
3.4.1. 1η-Δειγματοληψία.....	96
3.4.2. 2 ^η -Δειγματοληψία	101
Η υψηλή συγκέντρωση της ένωσης αυτής στην σωματιδιακή φάση σε σχέση με τις άλλες δύο δικαιολογείται από τον λιπόφιλο χαρακτήρα της.....	107
3.4.3. 3 ^η -Δειγματοληψία	108
5,6-διμέθυλο-βενζοτριαζόλη > Τολουλτριαζόλη > Βενζοτριαζόλη.....	110
3.4.4. Εμπορικά προϊόντα	112
3.5. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΣΤΗ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΗ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΤΗ ΦΑΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΙΣΟΘΕΡΜΩΝ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ.	113
3.5.1. Ισόθερμα και ισορροπία.....	113
3.5.2. «Δείκτης προσρόφησης» και επίδραση της συγκέντρωσης των σωματιδίων.....	114
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	118
4.1. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΠΟΥ ΑΦΟΡΟΥΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	118
4.2. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	122
4.3. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟΙ ΤΡΟΠΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ – ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΕΣ ΛΥΣΕΙΣ	126
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	128
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	133
7.1. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1.....	133
Α. Υγρά Απόβλητα	133
A1. Δειγματοληψία Νο 1	133
A2. Δειγματοληψία Νο 2	138
A3. Δειγματοληψία Νο 3.....	142
.....	142
Β. Σωματιδιακή Φάση	148
B1. Δειγματοληψία Νο 1.....	148
B2. Δειγματοληψία Νο 2.....	151
B3. Δειγματοληψία Νο 3.....	155
Γ. Εμπορικά προϊόντα	158
7.2. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 – ΠΙΝΑΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΥΠΑΡΞΗΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ ΜΗΤΡΑΣ	161

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Φυσικοχημικές ιδιότητες των τριαζολών.....	18
Πίνακας 1.2: Διάταξη μορίου τριαζόλης στο χώρο κατά την πρόσδεση του σε μεταλλική επιφάνεια	21
Πίνακας 1.3: Αποτελέσματα για το EC ₅₀ των ΒΖΤ και ΤΤΑ.....	25
Πίνακας 1.4: Οικοτοξικότητα της βενζοτριαζόλης και της τολυλτριαζόλης.....	27
Πίνακας 1.5: Τοξικότητα της βενζοτριαζόλης και της τολυλτριαζόλης.....	28
Πίνακας 1.6: Δείκτες λιποφιλίας των τριαζολών	33
Πίνακας 1.7: Αποικοδόμηση της βενζοτριαζόλης και της τολυλτριαζόλης.....	34
Πίνακας 2.1: Δειγματοληψίες.....	57
Πίνακας 3.1: Παράμετροι λειτουργίας του προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης.....	67
Πίνακας 3.2: Παράμετροι λειτουργίας του αυτόματου δειγματολήπτη (autosampler).....	69
Πίνακας 3.3: Πρόγραμμα ξηπλύματος της σύριγγας του αυτόματου δειγματολήπτη	69
Πίνακας 3.4: Εφαρμοζόμενο δυναμικό φακών εστίασης (Tube lens offset) και ενέργεια πρόσκρουσης (Source CID: source collision induced dissociation)	73
Πίνακας 3.5: Επιλογή θυγατρικών ιόντων.....	76
Πίνακας 3.6: Βέλτιστη ενέργεια πρόσκρουσης για κάθε ένα θραύσμα.....	79
Πίνακας 3.7: Ιόντα και Βέλτιστες Συνθήκες παρακολούθησης τους κατά την μέθοδο S.R.M. .	81
Πίνακας 3.20: Έλεγχος ύπαρξης παρεμπόδισης μήτρας και ποσοτικός προσδιορισμός των τριαζολών σε υγρό δείγμα Εισόδου από τον Σταθμό Βιολογικής Επεξεργασίας Λυμάτων (Σ.Β.Ε.Λ.)	102
Πίνακας 4.1: Σύγκριση παρούσας μελέτης με άλλες αντίστοιχες.....	121
Πίνακας 7.1: Ποσοτικός προσδιορισμός τριαζολών και έλεγχος παρεμπόδισης μήτρας σε υγρό δείγμα διαλύου Parshall από τον Σταθμό Βιολογικής Επεξεργασίας Λυμάτων (18/11/2005).....	161
Πίνακας 7.2: Ποσοτικός προσδιορισμός τριαζολών και έλεγχος παρεμπόδισης μήτρας σε υγρό δείγμα Β' Δεξαμενής από τον Σταθμό Βιολογικής Επεξεργασίας Λυμάτων (18/11/2005).....	161
Πίνακας 7.3: Ποσοτικός προσδιορισμός τριαζολών και έλεγχος παρεμπόδισης μήτρας σε υγρό δείγμα Εισόδου από τον Σταθμό Βιολογικής Επεξεργασίας Λυμάτων (14/12/2005)	162
Πίνακας 7.4: Ποσοτικός προσδιορισμός τριαζολών και έλεγχος παρεμπόδισης μήτρας σε υγρό δείγμα διαλύου Parshall από τον Σταθμό Βιολογικής Επεξεργασίας Λυμάτων (14/12/2005)	162
Πίνακας 7.5: Ποσοτικός προσδιορισμός τριαζολών και έλεγχος παρεμπόδισης μήτρας σε υγρό δείγμα Β' Δεξαμενής από τον Σταθμό Βιολογικής Επεξεργασίας Λυμάτων (14/12/2005).....	163

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: (α) Βενζοτριαζόλη, (β) Τολουλτριαζόλη, (γ) 5,6-διμέθυλο-βενζοτριαζόλη	17
Σχήμα 1.2: Ψεκασμός αεροσκάφους με αντιψυκτικό υγρό το οποίο περιέχει βενζοτριαζόλες.	20
Σχήμα 1.3: Πιθανές περιοχές συνδέσεων της τριαζόλης στον χαλκό	22
Σχήμα 1.4: Παράλληλη και κάθετη πρόσδεση του μορίου της τριαζόλης στην μεταλλική επιφάνεια.....	22
Σχήμα 1.5: Μηχανισμός δράσης των τριαζολών έναντι της ανάπτυξης μυκητών	24
Σχήμα 1.6: Προσρόφηση και απορρόφηση ενώσεων σε στερεό υπόστρωμα	29
Σχήμα 1.7: Σχεδιάγραμμα εγκατάστασης του Βιολογικού καθαρισμού.....	36
Σχήμα 2.1: Διαδικασία εκχύλισης στερεάς φάσης.....	41
Σχήμα 2.2: Συσκευή για εκχύλιση στερεάς φάσης (manifold)	42
Σχήμα 2.3: Δομή προσροφητικού υλικού των cartridges (Waters Oasis HLB)	42
Σχήμα 2.4: Σύστημα και συσκευή εκχύλισης Soxhlet	44
Σχήμα 2.5: Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (H.P.L.C.).....	48
Σχήμα 2.6: Σχηματισμός σταγόνων διαλύματος κατά τον ηλεκτροψεκασμό	51
Σχήμα 2.7: Συσκευή ηλεκτροψεκασμού.....	52
Σχήμα 2.8: Σχηματική αναπαράσταση φασματομέτρου μαζών με τρία τετράπολα.....	53
Σχήμα 2.9: Σχηματική αναπαράσταση τετραπόλου	53
Σχήμα 2.10: Αναλυτική διαδικασία επεξεργασίας διαλυτής και σωματιδιακής φάσης.	63
Σχήμα 3.1: Προτεινόμενος μηχανισμός θραυσματοποίησης της βενζοτριαζόλης.....	76
Σχήμα 3.2: Προτεινόμενος μηχανισμός θραυσματοποίησης της τολουλτριαζόλης	77
Σχήμα 3.3: Προτεινόμενος μηχανισμός θραυσματοποίησης της 5,6-διμέθυλο-βενζοτριαζόλης	77
Σχήμα 4.1: Δομή LAS	126

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Χρωματογράφημα 3.1: Βαθμιδωτή έκλυση(πρόγραμμα έκλυσης-Πίνακ. 3.1)	67
Χρωματογράφημα 3.2: Ισοκρατική έκλυση (60% μεθανόλη, 40% απιονισμένο νερό +0.2% οξικό οξύ)	68
Χρωματογράφημα 3.3: Πλήρης σάρωση της βενζοτριαζόλης	74
Χρωματογράφημα 3.4: Πλήρης σάρωση της τολυλτριαζόλης	75
Χρωματογράφημα 3.5: Πλήρης σάρωση της 5,6-διμέθυλοβενζοτριαζόλης (πρόδρομο ιόν=148)	75
Χρωματογράφημα 3.6: Πρότυπο μίγμα των τριών ενώσεων (20ppb).....	79
Χρωματογράφημα 3.7: Βενζοτριαζόλη	80
Χρωματογράφημα 3.8: Τολυλτριαζόλη	80
Χρωματογράφημα 3.9: 5,6-διμέθυλο-βενζοτριαζόλη.....	81
Χρωματογράφημα 7.1: Είσοδος - 10 φορές αραιώση (10/06/2005)	133
Χρωματογράφημα 7.2: Είσοδος (14/12/2005).....	142
Χρωματογράφημα 7.3: Είσοδος - Προσθήκη: 80ppb (14/12/2005)	143
Χρωματογράφημα 7.4: Διάλυλος Parshall (14/12/2005)	144
Χρωματογράφημα 7.5: Διάλυλος Parshall - Προσθήκη: 80ppb (14/12/2005).....	145
Χρωματογράφημα 7.6: Β' Δεξαμενή (14/12/2005)	146
Χρωματογράφημα 7.7: Β' Δεξαμενή - Προσθήκη: 80ppb (14/12/2005)	147
Χρωματογράφημα 7.8: Α' Λάσπη (10/06/2005)	148
Χρωματογράφημα 7.9: Β' Λάσπη (10/06/2005)	149
Χρωματογράφημα 7.10: Αφυδατωμένη Λάσπη (10/06/2005)	150
Χρωματογράφημα 7.11: Είσοδος - Σωματιδιακή Φάση (21/11/2005).....	151
Χρωματογράφημα 7.12: Διάλυλος Parshall - Σωματιδιακή Φάση (21/11/2005)	152
Χρωματογράφημα 7.13: Β' Δεξαμενή - Σωματιδιακή Φάση (21/11/2005)	153
Χρωματογράφημα 7.14: Αφυδατωμένη Λάσπη - Σωματιδιακή Φάση (21/11/2005)	154
Χρωματογράφημα 7.15: Είσοδος - Σωματιδιακή Φάση (13/12/2005).....	155
Χρωματογράφημα 7.16: Διάλυλος Parshall - Σωματιδιακή Φάση (13/12/2005)	156
Χρωματογράφημα 7.17: Β' Δεξαμενή - Σωματιδιακή Φάση (13/12/2005)	157
Χρωματογράφημα 7.18: Αντιψυκτικό (αραιωμένο 100 φορές) - Εμπορικά Προϊόντα (13/12/2005)	158
Χρωματογράφημα 7.19: Skip - Εμπορικά Προϊόντα (02/06/2005)	159
Χρωματογράφημα 7.20: Calgonit (αραιωμένο 50 φορές): Απορρυπαντικό πλυντηρίου πιάτων - Εμπορικά Προϊόντα (19/11/2005)	160

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 3.1: Βενζοτρίαζόλη (Αφθονία - Ενέργεια πρόσκρουσης)	78
Διάγραμμα 3.2: Τολουλτρίαζόλη (Αφθονία - Ενέργεια πρόσκρουσης)	78
Διάγραμμα 3.3: 5,6-διμέθυλο-βενζοτρίαζόλη (Αφθονία - Ενέργεια πρόσκρουσης).....	78
Διάγραμμα 4.1: Καμπύλη αναφοράς για την βενζοτρίαζόλη.....	83
Διάγραμμα 5.1: Μελέτη ύπαρξης παρεμπόδισης μήτρας (matrix effect) και υπολογισμός ποσότητας με την μέθοδο προσθήκης γνωστής ποσότητας.	95
Διάγραμμα 5.2: Επί τοις % κατανομή τριαζολών σε υγρά δείγματα του Σ.Β.Ε.Λ.	98
Διάγραμμα 5.3: Επί τοις % κατανομή τριαζολών στην σωματιδιακή φάση λυμάτων από τον Σ.Β.Ε.Λ. (1 ^η δειγματοληψία: Μάιος).....	99
Διάγραμμα 5.4: Επί τοις % κατανομή τριαζολών σε υγρά δείγματα του Σ.Β.Ε.Λ.	105
Διάγραμμα 5.5: Επί τοις % κατανομή τριαζολών στην σωματιδιακή φάση λυμάτων από τον Σ.Β.Ε.Λ. (2 ^η δειγματοληψία: Νοέμβριος).....	107
Διάγραμμα 5.7: Επί τοις % κατανομή τριαζολών σε υγρά δείγματα του Σ.Β.Ε.Λ.	109
Διάγραμμα 5.8: Επί τοις % κατανομή τριαζολών στην σωματιδιακή φάση λυμάτων από τον Σ.Β.Ε.Λ. (3 ^η δειγματοληψία: Δεκέμβριος).....	110

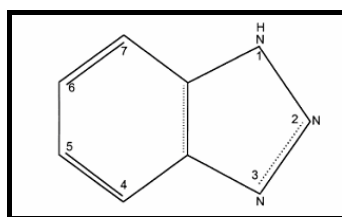
Ονομασίες - Συντομογραφίες

<u>Συντομογραφία</u>	<u>Αγγλική ονομασία</u>	<u>Ελληνική απόδοση</u>
BZT	1H-Benzotriazole	Βενζοτρίαζόλη
TTA	Tolyltriazole	Τολυλτρίαζόλη
5,6-DM-BZT	5,6-Dimethyl-1H-Benzotriazole	5,6-διμέθυλο-βενζοτρίαζόλη
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
LC	Liquid Chromatography	Υγρή χρωματογραφία
ESI	Electrospray Ionization	Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό
MS	Mass Spectrometry	Φασματομετρία μάζας
ADFs	Aircraft Deicing Fluids	Αντιψυκτικά υγρά αεροσκαφών
EG	Ethylene Glycol	Αιθυλενογλυκόλη
PG	Propylene Glycol	Προπυλενογλυκόλη
EPA	Environmental Protection Agency	Αντιπροσωπία περιβαλλοντικής προστασίας
SRM	Selected Reaction Monitoring	Παρακολούθηση χαρακτηριστικής αντίδρασης
SIM	Selected Ion Monitoring	Παρακολούθηση χαρακτηριστικού ιόντος
SPE	Solid Phase Extraction	Εκχύλιση στερεάς φάσης
LD50	Lethal Dose	Θανατηφόρος δόση
LC50	Lethal Concentration	Θανατηφόρος συγκέντρωση
EC50	Effective Concentration	Αποτελεσματική συγκέντρωση
NIH	National Institute of Health	Διεθνές ινστιτούτο υγείας
r.f.	radio frequency	Ραδιοσυχνότητα
d.c.	direct current	Σταθερό δυναμικό
LOD	Limit of Detection	Όριο ανίχνευσης
LOQ	Limit of Quantification	Όριο ποσοτικοποίησης
MDL	Method Detection Limit	Όριο ανίχνευσης μεθόδου

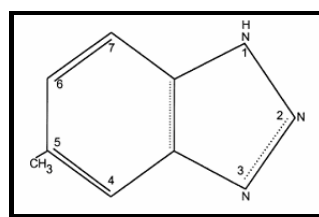
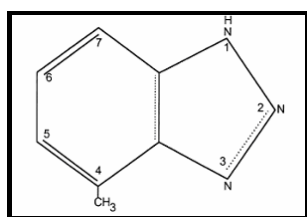
1. Θεωρητικό μέρος

1.1. Εισαγωγή

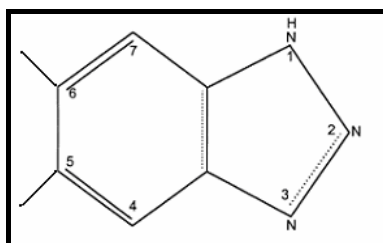
Οι βενζοτριαζόλες περιέχουν ένα πενταμελή δακτύλιο, με τρία άτομα αζώτου άμεσα συνδεδεμένα μεταξύ τους (τα δύο με διπλό δεσμό και το τρίτο με απλό), κι ένα δακτύλιο βενζολίου. Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται τολουλ- ή διμέθυλ- παράγωγα όταν φέρουν ένα ή δύο μεθύλια στον εξαμελή δακτύλιο. Έτσι υπάρχουν κι άλλα πιθανά παράγωγα της βενζοτριαζόλης (BZT: 1H-Benzotriazole)^α, όπως είναι η τολουλτριαζόλη (TTA: tolyltriazole)^β και η 5,6-διμέθυλο-βενζοτριαζόλη (5,6-DM-BZT: 5,6-dimethyl-1H-Benzotriazole)^γ. Οι δομές των ενώσεων, τις οποίες πραγματεύεται η παρούσα εργασία φαίνονται στο ακόλουθο Σχήμα 1.1.



(α)



(β)



(γ)

Σχήμα 1.1: (α) Βενζοτριαζόλη, (β) Τολουλτριαζόλη, (γ) 5,6-διμέθυλο-βενζοτριαζόλη

Η βενζοτρίαζόλη και τα παράγωγα της είναι πολύ σημαντικά στην σύνθεση, στην αναλυτική χημεία, στη φαρμακευτική χημεία και στην βιομηχανία. Οι πληροφορίες όμως που προέρχονται από τις δημοσιεύσεις είναι περιορισμένες όσον αφορά την χημεία, την τοξικότητα και την βιοαποικοδόμηση των ενώσεων αυτών. Η σημαντικότητα των στοιχείων αυτών είναι φανερή, καθώς η γνώση τέτοιου είδους δεδομένων θα συνέβαλε στην αποτίμηση του αποτελέσματος της χρήσης αυτών των ενώσεων στο περιβάλλον [1]. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η βιβλιογραφία είναι ιδιαίτερα περιορισμένη για την 5,6-διμέθυλο-βενζοτρίαζόλη, καθώς μόνο μία δημοσίευση αναφέρεται στην χρήση της (Cancilla et.al., 1997).

1.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες των τριαζολών

Οι βενζοτρίαζόλες είναι μη εύφλεκτες ουσίες, σχεδόν άχρωμες με χαμηλή τάση ατμών και χαμηλό συντελεστή κατανομής (partition coefficient). Οι ομοιότητες στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες προέρχεται από την ομοιότητα της χημικής δομής τους.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των τριαζολών αναγράφονται στον Πίνακα 1.1:

Ένωση	Βενζοτρίαζόλη	Τολουτρίαζόλη	5,6-διμέθυλο-Βενζοτρίαζόλη
Κωδικός (cas#)	95-14-7	29385-43-1	4184-79-6
Μοριακό βάρος	119,1	133,2	147,17
Φυσική κατάσταση	Κίτρινο στερεό ή σκόνη	Μπεζ κόκκοι	Μπεζ κόκκοι
Σημείο τήξης	100 °C	76-87 °C	154-156 °C
Σημείο βρασμού	204 °C (20 hPa)	160°C (2,67 hPa)	165,19 °C
Πυκνότητα	1,19 g/cm ³ (100°C)	1,13 g/cm ³ (100°C)	Μη διαθέσιμη
Τάση ατμών	0,000797 hPa (25°C) (EPIWIN)	0,000797 hPa (25°C) (EPIWIN)	Μη διαθέσιμη
Συντελεστής κατανομής (logK _{ow})	1,34	1,71	
Διαλυτότητα	1-5 mg/l (24°C)	<0,1g/l (18°C)	

Πίνακας 1.1: Φυσικοχημικές ιδιότητες των τριαζολών.[20]

EPIWIN = EPIWIN modeling Program. Meylan, W. and Howard, P. (1999)

1.3. Χρήση των τριαζολών στα αντιψυκτικά υγρά αεροσκαφών

Τα αντιψυκτικά υγρά χρησιμοποιούνται στα περισσότερα αεροδρόμια χωρών με παγωμένο κλίμα. Η ασφάλεια των αερομεταφορών απαιτεί την χρήση αυτών των χημικών παρασκευασμάτων, προκειμένου να διατηρούνται τα αεροδρόμια ελεύθερα από τον πάγο και το χιόνι. Για να εξασφαλιστεί λοιπόν η ασφάλεια της απογείωσης και της προσγείωσης των αεροσκαφών, απαιτείται συχνά η χρήση αντιψυκτικών υγρών (Aircraft Deicing Fluids: ADFs) τόσο για τα αεροπλάνα όσο και για τους διαδρόμους προσγείωσης των αεροσκαφών. Τα αντιψυκτικά υγρά ADFs αποτελούνται κυρίως από προπυλενογλυκόλη (PG) ενώ τα αντιψυκτικά υγρά των αεροδιαδρόμων αποτελούνται κυρίως από προπυλενογλυκόλη (PG) ή αιθυλενογλυκόλη (EG) περιέχοντας και οξικό κάλιο, φορμικό οξύ ή ουρία [2].

Η προπυλενογλυκόλη λοιπόν αποτελεί το κύριο συστατικό των αντιψυκτικών υγρών. Η παρουσία της σε αυτά συμβάλλει στην ταπείνωση του σημείου πήξεως του νερού μέχρι και τους $-59\text{ }^{\circ}\text{C}$, ανάλογα με τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται [3]. Παράλληλα, στα αντιψυκτικά υγρά γίνεται προσθήκη κάποιων ουσιών με σκοπό να βελτιώσουν τις ιδιότητες των υγρών αυτών. Οι ιδιότητες αυτές αφορούν στην παρεμπόδιση ανάπτυξης τριβής, ανάφλεξης και οξειδωσης πάνω στις μεταλλικές επιφάνειες. Τέτοιου είδους ιδιότητες προσδίδουν στα αντιψυκτικά υγρά οι ενώσεις που πραγματεύεται η παρούσα εργασία και είναι οι εξής: βενζοτριαζόλη, τολουλτριαζόλη, 5,6-διμέθυλοβενζοτριαζόλη.

Αξίζει να αναφερθεί ότι το αποτέλεσμα, της χρήσης αυτών των πρόσθετων ουσιών, στο περιβάλλον δεν έχει γίνει ακόμα απόλυτα κατανοητό. Είναι όμως βέβαιο ότι χρήση αυτών των πρόσθετων ουσιών στα σκευάσματα της αιθυλενογλυκόλης ή της προπυλενογλυκόλης τα κατέστησε περισσότερο τοξικά για το περιβάλλον [4-6].

Όπως προαναφέρθηκε η εξασφάλιση της κινητικότητας και της ασφάλειας σε αεροδρόμια χωρών με παγωμένο κλίμα απαιτεί μεγάλες ποσότητες αντιψυκτικών υγρών τα οποία χρησιμοποιούνται τόσο για την

αποφυγή πάγου πάνω στο αεροσκάφος όσο και στους αεροδιαδρόμους. Στο Σχήμα 1.2 παρουσιάζεται μια τυπική φωτογραφία χρήσης αντιψυκτικού υγρού σε μορφή spray σε ένα αεροσκάφος.



Σχήμα 1.2: Ψεκάσμος αεροσκάφους με αντιψυκτικό υγρό το οποίο περιέχει βενζοτρίαζόλες.[7]

1.4. Αντιδιαβρωτική προστασία

Η βενζοτρίαζόλη και τα παράγωγα της αποτελούν κύριους παράγοντες προστασίας μετάλλων από οξείδωση και διάβρωση. Η χρήση αυτών έγινε ευρεία τα τελευταία τριάντα χρόνια, ενώ το δημοφιλέστερο αυτών των παραγώγων είναι η τολουλτριαζόλη [8]. Η τολουλτριαζόλη προστίθεται στα αντιψυκτικά υγρά (ADFs: Aircraft Deicing Fluids) σε συγκέντρωση 0,5% w/w, προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος ανάφλεξης που δημιουργείται κατά την επαφή των διαλυμάτων γλυκόλης με μεταλλικά μέρη απ' όπου υπάρχει διέλευση ρεύματος [9]. Αυτό γίνεται πιο κατανοητό αν σκεφτούμε ότι η τολουλτριαζόλη καλύπτει τους μεταλλικούς αγωγούς μετριάζοντας έτσι την οξείδωση τους και κατά συνέπεια και τον κίνδυνο ανάφλεξης.

Οι αντιοξειδωτικοί αυτοί παράγοντες παρέχουν προστασία έναντι της οξείδωσης σε επιφάνειες κραμάτων χαλκού οι οποίες έρχονται σε επαφή με νερό, ενώ παράλληλα εμποδίζουν την γαλβανική διάβρωση σιδερένιων επιφανειών παρεμποδίζοντας την εναπόθεση χαλκού πάνω σ' αυτές τις

επιφάνειες. Η χρήση λοιπόν αυτών των ενώσεων συμβάλει σημαντικά στην παρεμπόδιση της διάβρωσης αυτών των επιφανειών, η οποία μπορεί να έχει καταστρεπτικά αποτελέσματα στη δομική ακεραιότητα και στη λειτουργία του συστήματος το οποίο φέρει τέτοιου είδους μέταλλα (παρουσία υδάτινου περιβάλλοντος).

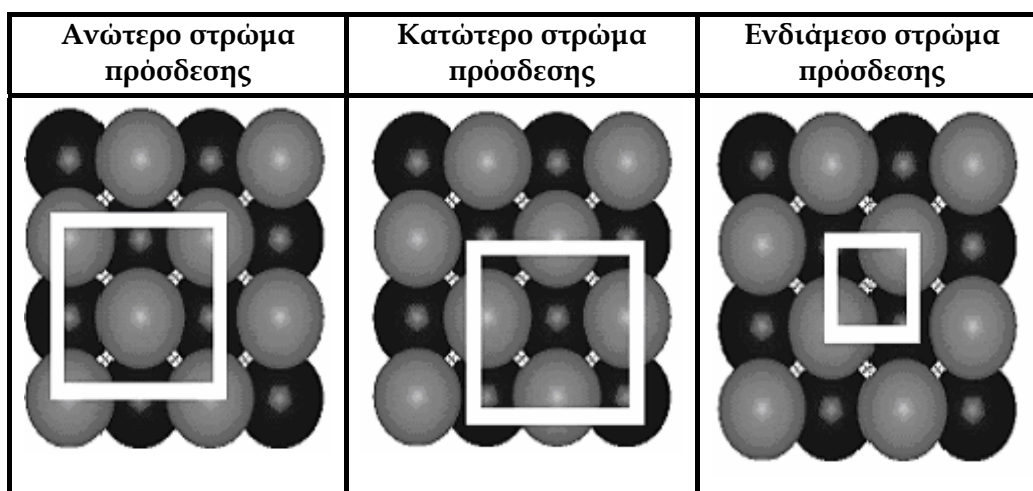
Η προστασία κατά της οξείδωσης σε μέταλλα, παρουσία υδάτινου περιβάλλοντος, βασίζεται στην ιδιότητα των ενώσεων αυτών να σχηματίζουν ένα υδρόφοβο στρώμα (υδρόφοβη ταινία) στην επιφάνεια του μετάλλου (Σχήματα 1.3-1.4). Η αλληλεπίδραση της μεταλλικής επιφάνειας με την ένωση γίνεται μέσω των τριών αζώτων τα οποία φέρει ο πενταμελής δακτύλιος. Λαμβάνουν χώρα δύο τύποι διαμόρφωσης στον χώρο:

- 1) Η *παράλληλη (flat type)*, όπου το μόριο επικάθεται σε παράλληλη θέση με την επιφάνεια του χαλκού (Σχήμα 1.4), και
- 2) Η *κάθετη (Up-2 type)*, στην οποία το μόριο βρίσκεται σε κάθετη θέση προς την επιφάνεια του χαλκού (Σχήμα 1.4).

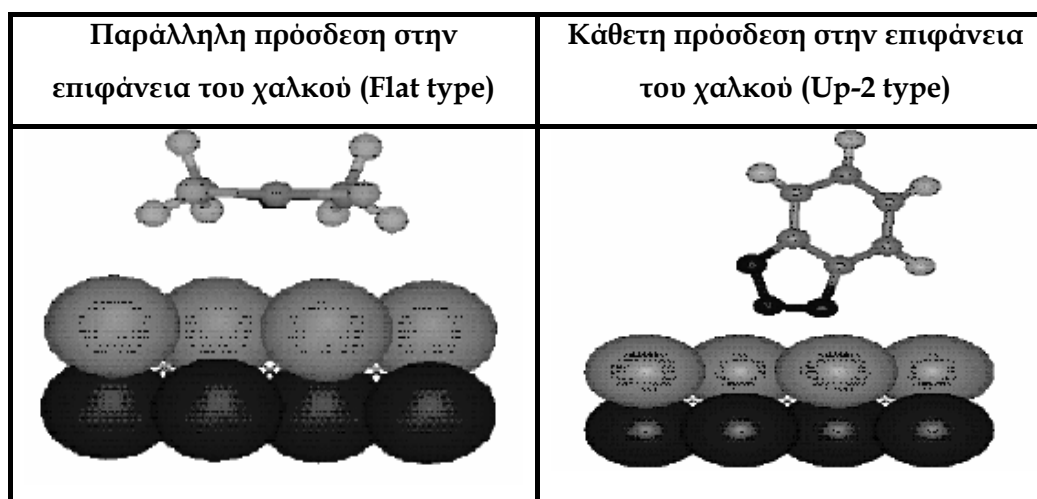
Ο τρόπος με τον οποίο αλληλεπιδρούν οι τριαζόλες αυτές με την επιφάνεια του μετάλλου, καθώς και η διάταξη τους στον χώρο περιγράφονται στον Πίνακα 1.2 και στα Σχήματα 1.3 και 1.4.

Πίνακας 1.2: Διάταξη μορίου τριαζόλης στο χώρο κατά την πρόσδεση του σε μεταλλική επιφάνεια [10].

Ένωση	Προσανατολισμός με την επιφάνεια του χαλκού.	Ενέργεια Δεσμού (kcal/mole)
BZT	Παράλληλη με την επιφάνεια του χαλκού	12.7
BZT	Κάθετη στην επιφάνεια του χαλκού	30.2
TTA	Κάθετη στην επιφάνεια του χαλκού	≈31
5,6-DM-BZT	Κάθετη στην επιφάνεια του χαλκού	Άγνωστη



Σχήμα 1.3: Πιθανές περιοχές συνδέσεων της τριαζόλης στον χαλκό [13].



Σχήμα 1.4: Παράλληλη και κάθετη πρόσδεση του μορίου της τριαζόλης στην μεταλλική επιφάνεια [13].

Αξίζει να αναφερθεί ότι όσο περισσότερο υποκατεστημένη - αλκυλιωμένη είναι η ένωση η οποία χρησιμοποιείται σαν αντιοξειδωτικός παράγοντας, τόσο περισσότερο υδρόφοβο είναι το στρώμα που δημιουργείται, παρέχοντας έτσι καλύτερη προστασία κατά της οξείδωσης του μετάλλου. Η τελευταία εξαρτάται από τον βαθμό υποκατάστασης τους. Για τον λόγο αυτό, η διμεθυλιωμένη αλλά και η μονομεθυλιωμένη τριαζόλη (υποκατεστημένες ενώσεις) μπορούν να προσδεθούν στο μέταλλο μόνο μέσω μιας UP-2 διάταξης στο χώρο, σε αντίθεση με την μη μεθυλιωμένη τριαζόλη η οποία έχει την δυνατότητα πρόσδεσης και με τους δύο τρόπους.

Φασματοσκοπικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι η ταινία - στρώμα που δημιουργείται έχει μοριακή αναλογία 1:1, μεταξύ του Cu(I) και της τριαζόλης. Αυτό το σύμπλοκο φαίνεται να προστατεύει τον χαλκό από περαιτέρω οξείδωση. Η ταινία που διαμορφώνεται από την TTA θεωρείται περισσότερο ανθεκτική, παρουσία υδάτινου περιβάλλοντος, σε σχέση με αυτήν της BZT. Αυτό οφείλεται στην παρουσία του μεθυλίου στην πρώτη, γεγονός που την καθιστά περισσότερο υδρόφοβη, σε αντίθεση με την BZT η οποία είναι λιγότερο υδρόφοβη ένωση και ευκολότερα διαπερατή. Με την ίδια λογική και η 5,6-DM-BZT είναι περισσότερο ανθεκτική και παρέχει καλύτερη προστασία εναντίον της οξείδωσης σε μεταλλικά μέρη σε σχέση με την TTA. Συνεπώς η αποτελεσματικότητα έναντι της οξείδωσης ακολουθεί την σειρά: 5,6-DM-BTA > TTA > BZT.

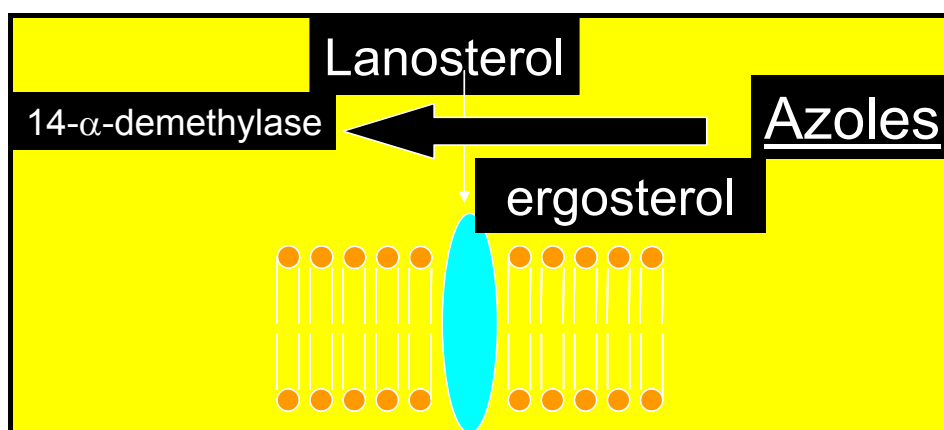
Αξίζει να σημειωθεί ότι από μελέτες έχει προκύψει ότι αυτό το στρώμα μπορεί να καταστραφεί παρουσία οξειδωτικών βιοκτόνων ουσιών όπως είναι το χλώριο [11]. Έχει αποδειχθεί ότι η ταινία TTA είναι ανθεκτικότερη, παρουσία χαμηλών επιπέδων ελεύθερου χλωρίου, απ' ό,τι η ταινία BZT [12],[13]. Ενώ, πιο μακροχρόνια έκθεση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του ελεύθερου χλωρίου κατέδειξαν καταστροφή της ταινίας αυτής όταν δεν υπάρχει παρουσία περίσσειας της τριαζόλης [14],[15]. Για να υπερνικηθεί αυτή η αδυναμία, χρησιμοποιήθηκε περίσσεια τριαζόλης ($\approx 2,5$ mg/L) στο νερό με σκοπό την επισκευή των κατεστραμμένων περιοχών της ταινίας αυτής.

Συνοψίζοντας, οι προαναφερθείσες τριαζόλες παρέχουν αντιοξειδωτική προστασία σε μεταλλικές επιφάνειες. Η προστασία αυτή είναι γνωστή και σαν *silver protection* κι επιτυγχάνεται με συνδυασμό των υδρόφοβων και στερεικών ιδιοτήτων των παραπάνω ενώσεων.

1.5. Αντιμυκητιακή δράση των τριαζολών

Όπως αναφέρθηκε στο τμήμα της περίληψης οι τριαζόλες παρουσιάζουν αντιμυκητιακές ιδιότητες [16], και για τον λόγο αυτό περιέχονται σε μυκητοκτόνα διαλύματα. Η ιδιότητα τους αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι οι τριαζόλες αναστέλλουν τον σχηματισμό ενός ειδικού ενζύμου, της C14-διμεθυλάσης, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό στερόλης. Κατά συνέπεια συμβάλλει σημαντικά στην παρεμπόδιση ανάπτυξης και στην καταστροφή μυκητών, μιας και οι στερόλες αποτελούν σημαντικά συστατικά των μυκητιακών κυτταρικών μεμβρανών.

Ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα ώστε οι τριαζόλες να προάγουν την παρεμπόδιση μυκητών, παριστάνεται σχηματικά ακολούθως:



Σχήμα 1.5: Μηχανισμός δράσης των τριαζολών έναντι της ανάπτυξης μυκητών [17].

1.6. Ανθρώπινη έκθεση στις βενζοτριαζόλες

Η ανθρώπινη έκθεση στην βενζοτριαζόλη και στα άλλα δύο παράγωγα της γίνεται κυρίως με τους ακόλουθους τρόπους:

- Εισπνοή (εισπνεόμενα σωματίδια)
- Δερματική επαφή
- Επαφή με τα μάτια

Ενώ κύριες πηγές έκθεσης του ανθρώπου σε τριαζόλη, είναι οι εξής:

- Βιομηχανίες παραγωγής της ένωσης
- Χρήση προϊόντων που την περιέχουν

1.7. Τοξικότητα της βενζοτρίαζόλης και της τολουλτριαζόλης

Σε μελέτη που έγινε από τους D. Cancilla et al. το 1996, τα αποτελέσματα επαλήθευσαν την παρουσία των ΤΤΑ και ΒΖΤ στα αντιψυκτικά υγρά [18]. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μελέτη αυτή (λαμβάνοντας υπόψη ότι η τολουλτριαζόλη αποτελεί μίγμα της 4 και 5 μέθυλ-βενζοτρίαζόλης) και αφορούν την τοξικότητα της ΒΖΤ και της ΤΤΑ είναι τα ακόλουθα:

- Η ΤΤΑ και η ΒΖΤ έχουν τοξική δραστηριότητα.
- Η ΤΤΑ εμφανίστηκε να έχει μεγαλύτερη τοξικότητα σε σχέση με αυτήν της ΒΖΤ (Πίνακας 1.3).

Πίνακας 1.3: Αποτελέσματα για το EC₅₀ των ΒΖΤ και ΤΤΑ [21]

	EC ₅₀ (mg/l) - 5 min
BZT	41
TTA	6

- Η τολουλτριαζόλη παρεμποδίζει την αποικοδόμηση της προπυλενογλυκόλης περισσότερο σε σχέση με άλλα πρόσθετα
- Η τολουλτριαζόλη είναι περισσότερο τοξική στους μικροοργανισμούς, σε σχέση με άλλες ουσίες και η σειρά τοξικότητας είναι η εξής: 4-MeBT < BZT < 5-MeBT.
- Η ΤΤΑ είναι περισσότερο βιοσυσσωρεύσιμη απ' ότι αποικοδομήσιμη

Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο είναι η τοξικότητα των ενώσεων που προκύπτουν από την αποικοδόμηση των πρόσθετων στα αντιψυκτικά ενώσεων. Η αποικοδόμηση διαφόρων πρόσθετων σε αντιψυκτικά υγρά μπορεί να δώσει προϊόντα μεγαλύτερης τοξικότητας σε σχέση με τις πρόδρομες ενώσεις. Για παράδειγμα οι αζόλες, στην οικογένεια των οποίων

ανήκουν η ΒΖΤ και η ΤΤΑ, είναι γνωστές για την βιομετατροπή τους υπό αναερόβιες συνθήκες σε πιο τοξικές ενώσεις, όπως είναι οι αρωματικές αμίνες και οι νίτρο- ενώσεις. Οι αναερόβιες συνθήκες, προξενούνται από την υψηλή ζήτηση οξυγόνου κατά την αποικοδόμηση της γλυκόλης, και μπορούν να καταλύσουν τον σχηματισμό περισσότερο τοξικών παραπροϊόντων όταν αποσυντεθούν οι πρόσθετες στην γλυκόλη ουσίες.

Σύμφωνα με μία αναφορά της EPA (Environmental Protection Agency)-1997 η ΒΖΤ θεωρήθηκε ουσία πολύ χαμηλής τοξικότητας και παράγοντας μικρού κινδύνου για την ανθρώπινη υγεία. Στο ίδιο έγγραφο αναφέρεται ότι δύο παράγωγα της ίδιας ένωσης παρουσιάζουν μεταλλαξιογόνο δράση σε βακτηριακά συστήματα. Ένα χρόνο αργότερα το Διεθνές Ινστιτούτο Υγείας (NIH: National Institute of Health) δημοσίευσε ένα άρθρο στο οποίο αναφέρονταν ότι δεν υπήρχε αποδεδειγμένη καρκινογόνος δράση των ουσιών αυτών (NIH, 1998).

1.7.1. Οικοτοξικότητα της βενζοτριαζόλης και της τολουλτριαζόλης

Επειδή οι βενζοτριαζόλες χρησιμοποιούνται σε μεγάλες ποσότητες σαν αντιοξειδωτικοί παράγοντες, κυρίως μέσω αυτής της χρήσης μπορεί να αποτελέσουν περιβαλλοντικό ρυπαντή. Σαν οξειδωτικοί αναστολείς και επιβραδυντές πυρκαγιάς, χρησιμοποιούνται στα αντιψυκτικά σε συγκεντρώσεις 0,01-2,0% και στα αντιψυκτικά αεροσκαφών (Aircraft Deicing Fluids: ADFs) σε άγνωστες συγκεντρώσεις, μεγαλύτερες του 10% [19]. Η χρήση των αντιψυκτικών μπορεί να οδηγήσει στην διάχυση των ενώσεων προς το περιβάλλον. Επίσης, ένα ποσοστό περίπου 80% από τα ADFs εναποτίθεται στο έδαφος, σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη [20].

Η ΒΖΤ και η ΤΤΑ έχουν μελετηθεί για την σταθερότητα τους στο χώμα, το νερό, και το ξύλο. Όπως προκύπτει από τις μελέτες αυτές, οι ενώσεις αυτές είναι ιδιαίτερα σταθερές στο χώμα ή το νερό. Έχει επίσης βρεθεί ότι οι ενώσεις αυτές αποτελούν ένα ισχυρό ανασταλτικό παράγοντα της ανάπτυξης φυτικών

οργανισμών. Έχει λοιπόν καταστρεπτικά αποτελέσματα σε διάφορα είδη, σε επίπεδα περίπου 0,1 mg/ml.

Οι βενζοτρίαζόλες έχουν τοξικά αποτελέσματα και για το υδάτινο περιβάλλον [21]. Το όριο ανεκτικότητας για μικρά ψάρια είναι 27,5 ppm μετά από 48 ώρες και 25 ppm μετά από 96 ώρες (~ 0,2 mM). Για τις πέστροφες το όριο είναι 15 ppm μετά από 48 ώρες και 12 ppm μετά από 96 ώρες. Ο αριθμός θανάτων είναι μεγαλύτερος μετά από 96 ώρες απ' ότι 48 ώρες, κι αυτό γιατί έχει αθροιστική δράση στα ψάρια. Από στοιχεία τα οποία δίνονται από την EPA (Environmental Protection Agency) προκύπτουν τα δεδομένα που αναγράφονται στον Πίνακα 1.4 και αφορούν στοιχεία τοξικότητας της ΒΖΤ και της ΤΤΑ στο οικοσύστημα.

Στον πίνακα αυτό αναφέρονται οι όροι LC₅₀ και EC₅₀. Η συντομογραφία LC₅₀ (lethal concentration), περιγράφει την συγκέντρωση που απαιτείται για να οδηγηθεί στον θάνατο το 50 % του υπό μελέτη πληθυσμού. Ενώ το EC₅₀ (effective concentration) αντιστοιχεί στην μοριακή συγκέντρωση που μπορεί να προκαλέσει αντίδραση στο 50% του είδους που μελετάται.

Πίνακας 1.4: Οικοτοξικότητα της βενζοτρίαζόλης και της τολυλτριαζόλης.[22]

	Βενζοτρίαζόλη	Τολυλτριαζόλη
Όξεια τοξικότητα σε ψάρια	B. rerio ≥ 100 mg/l	B. rerio = 65 mg/l
96 hr LC ₅₀ *	S.gairdneri = 39mg/l	L. macrochirus = 31 mg/l P. promelas = 25.5 mg/l S.gaidneri = 21.4 mg/l
Όξεια τοξικότητα σε ασπόνδυλα, 48 ώρες, EC ₅₀ **	D. magna = 91-141 mg/l	D. magna = 35.4 mg/l
Τοξικότητα σε άλγη, 72 ώρες, EC ₅₀ **	S. subspicatus = 231 mg/l (νεόπλασμα) 102 mg/l (βιομάζα)	S. subspicatus = 62 mg/l (νεόπλασμα) 32 mg/l (βιομάζα)

Όπως προκύπτει από τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα η ΤΤΑ είναι ελαφρώς πιο τοξική απ' ότι η ΒΖΤ. Αξίζει να αναφερθεί ότι έχουν

πραγματοποιηθεί μελέτες για την τοξικότητα των τριαζολών σε διάφορα είδη φυτών προκειμένου να καθοριστεί εάν τα φυτά διαθέτουν μηχανισμούς αντίδρασης - αντίστασης σε διαλύματα ΒΖΤ (βλ. Κεφ. 5).

1.7.2. Διαθέσιμα στοιχεία τοξικότητας των τριαζολών σε θηλαστικά

Από μελέτες που έχουν γίνει όσον αφορά την τοξικότητα των τριαζολών σε θηλαστικά, προκύπτουν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

- Η έκθεση χοιριδίων σε διάλυμα ΒΖΤ σε αιθανόλη με συγκέντρωση μεγαλύτερη του 50% προκαλεί ήπιο ερεθισμό.
- Η έκθεση ποντικών σε ξηρή σκόνη προκαλεί ερύθημα και σοβαρό ερεθισμό στα μάτια [23].
- Η σίτιση αρουραίων με 0,6700 ή 12,000 ppm για 78 εβδομάδες δεν υπέδειξαν συμπτώματα καρκινογένεσης [24].

Επίσης από τον επίσημο κατάλογο τοξικότητας της ΕΡΑ, όσον αφορά την τοξικότητα της ΒΖΤ και της ΤΤΑ, προκύπτει ο Πίνακας 1.5 [25]:

Πίνακας 1.5: Τοξικότητα της βενζοτριαζόλης και της τολουλτριαζόλης

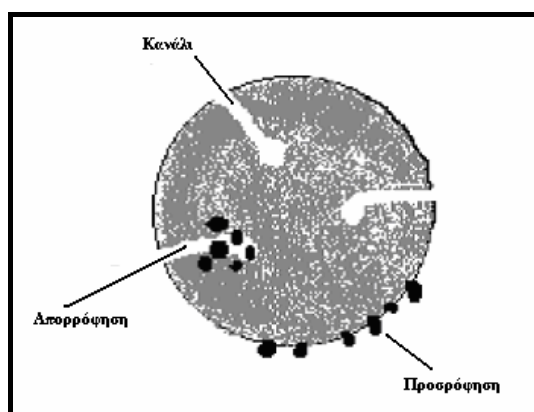
Οξεία τοξικότητα	Βενζοτριαζόλη	Τολουλτριαζόλη
Κατάποση LD50	560-909 mg/kg βιομάζας (αρουραίοι)	1470-1830 mg/kg βιομάζας (αρουραίοι)
Δερματική επαφή LD50	>10 mg/kg βιομάζας (κουνέλια)	>4 mg/kg βιομάζας (κουνέλια)
Εισπνοή LC50	>1,5 mg/l – 4 ώρες (αρουραίοι)	>1,73 mg/l – 1 ώρα (αρουραίοι)
Γονιδιακές μεταλλάξεις	Ames – θετικό HGPRT - αρνητικό	Ames - αρνητικό
Χρωμοσωμικές ανωμαλίες	Μη διαθέσιμα στοιχεία	DNA: Καταστροφή κι επιδιόρθωση – αρνητικό

1.8. Προσρόφηση τριαζολών στην σωματιδιακή φάση

Όπως προκύπτει από την παρούσα μελέτη, και θα αναφερθεί και παρακάτω, οι βενζοτριαζόλες παρουσιάζουν μικρή προσροφητική ικανότητα. Παρά όμως το χαμηλό ποσοστό της προσρόφησης το οποίο παρατηρείται, η ιδιότητα τους αυτή αποτελεί σημαντικό παράγοντα καθορισμού της τύχης των ενώσεων αυτών στο περιβάλλον. Αξίζει να σημειωθεί ότι το φαινόμενο της προσρόφησης είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ μορίων της ουσίας και των επιφανειακών μορίων του προσροφητή.

Το ποσοστό της προσρόφησης το οποίο λαμβάνει χώρα για ενώσεις οι οποίες έχουν διαλυθεί σε υδατική φάση εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του προσροφητικού υλικού και της προσροφούμενης ουσίας. Είναι γνωστό ότι όσο περισσότερο υδρόφοβη είναι μία ένωση τόσο μεγαλύτερη είναι η προσρόφηση της σε μία στερεά μήτρα [26]. Επίσης το ποσοστό προσρόφησης το οποίο λαμβάνει χώρα σε οργανικό υπόστρωμα καθορίζεται από ισόθερμες εξισώσεις.

Λόγω της πορώδους μορφής των μορίων των σωματιδίων, οι προσροφούμενες ενώσεις μπορούν εύκολα να διαπεράσουν τα σωματίδια αυτά και να γίνουν μέρος του συνολικού όγκου του στερεού [27]. Η προσρόφηση είναι φαινόμενο που λαμβάνει χώρο και στις τρεις διαστάσεις της στερεάς μήτρας. Πέραν του φαινομένου της προσρόφησης λαμβάνει χώρα και το φαινόμενο της απορρόφησης.



Σχήμα 1.6: Προσρόφηση και απορρόφηση ενώσεων σε στερεό υπόστρωμα [28].

Η απορρόφηση είναι μία διεργασία ρόφησης κατά την οποία η χημική ένωση διαπερνά το στερεό σώμα τουλάχιστον για μερικά νανόμετρα. Τα φαινόμενα της προσρόφησης (*adsorption*) και της απορρόφησης (*absorption*), απεικονίζονται πολύ εύστοχα στο Σχήμα 1.6.

Η ικανότητα ενός στερεού να προσροφά ενώσεις από ένα διάλυμα είναι συνάρτηση και της συγκέντρωσης της ένωσης αυτής στο υδατικό διάλυμα. Οι βενζοτριαζόλες παρουσιάζουν μικρή προσρόφηση στην σωματιδιακή φάση, όμως η συνύπαρξη της με υψηλή αναλογία οργανικού υλικού οδηγεί σε αύξηση του ποσοστού προσρόφησης [29]. Η άμεση εξάρτηση της έκτασης του φαινομένου από την περιεχόμενη οργανική ύλη του προσροφητή δείχνει ότι η εν λόγω διεργασία προκύπτει από τη μετάβαση κατά ένα ποσοστό (*partitioning*) της ουσίας από το διάλυμα σε οργανική φάση στην επιφάνεια ή εντός των σωματιδίων.

1.8.1. Κατηγορίες προσρόφησης

Όπως προαναφέρθηκε, η προσρόφηση είναι αποτέλεσμα ανάπτυξης δυνάμεων μεταξύ της ένωσης και του παράγοντα προσρόφησης (υποδοχέας). Ανάλογα με το είδος δυνάμεων που επικρατούν σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις διακρίνεται στις παρακάτω κατηγορίες: α) φυσική, β) χημική και γ) ηλεκτροστατική [30].

Στην *πρώτη κατηγορία* ανήκουν οι διεργασίες που οφείλονται στην δράση δυνάμεων ηλεκτροστατικής φύσεως, μικρής ισχύος κι εμβέλειας. Τέτοιες δυνάμεις αναπτύσσονται μεταξύ πολικών μορίων καθώς και μεταξύ μη πολικών και πολικών μορίων της ουσίας και του προσροφητή. Φυσική προσρόφηση συμβαίνει και κατά την αλληλεπίδραση ταχύτατα ταλαντούμενων ή στιγμιαίων διπολικών μονάδων λόγω της κίνησης των ηλεκτρονίων των μορίων (*London dispersion forces*). Συνήθως η ενέργεια του συστήματος των μορίων που αλληλεπιδρούν είναι αντιστρόφως ανάλογη με την έκτη δύναμη της μεταξύ τους απόστασης, εκτός και αν πρόκειται για

πολικά μόρια καθορισμένου προσανατολισμού όπου η δυναμική ενέργεια εξαρτάται από την τρίτη δύναμη της απόστασης.

Στην κατηγορία της *χημικής προσρόφησης* η σύνδεση των μορίων διαλυμένης ουσίας με συγκεκριμένες ομάδες επιφανειακών μορίων του προσροφητικού υλικού πραγματοποιείται με κλασσικούς χημικούς δεσμούς και χαρακτηρίζεται από υψηλή θερμότητα και απαιτούμενη θερμοκρασία. Παράδειγμα χημικής προσρόφησης έχουμε κατά τον σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών και δεσμών υδρογόνου.

Η *ηλεκτροστατική προσρόφηση* περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις τύπου Coulomb. Η διαφορά της με την πρώτη κατηγορία, όπου η φύση των δυνάμεων είναι επίσης ηλεκτροστατική, έγκειται στο γεγονός ότι στην περίπτωση αυτή οι αναπτυσσόμενες δυνάμεις είναι πολύ ισχυρότερες και μεγαλύτερης εμβέλειας. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις λαμβάνουν χώρα μεταξύ ιόντων καθώς και μεταξύ ιόντων και δίπολων.

1.8.2. Ισόθερμα προσρόφησης

Τα *ισόθερμα* ως γνωστόν αποτελούν μοντέλα που σχετίζουν την προσροφημένη ποσότητα C_s (μάζα ανά μονάδα μάζας προσροφητικού υλικού) με τη διαλυτή ποσότητα C_w (μάζα ανά μονάδα όγκου διαλύματος) της ουσίας στο σύστημα κατόπιν ισορροπίας και υπό σταθερή θερμοκρασία. Σε αυτήν την παράγραφο περιγράφονται δύο από τα κυριότερα μοντέλα ισοθερμών: το γραμμικό μοντέλο (Stern-Graham) και το μοντέλο Freundlich.

Το πιο απλό μοντέλο είναι το *γραμμικό Stern-Graham* σύμφωνα με το οποίο η σχέση των δύο παραμέτρων C_s και C_w είναι ανάλογη:

$$C_s = K_D C_w \quad (1.1)$$

Όπου K_D , συντελεστής κατανομής (partition coefficient).

Το γραμμικό ισόθερμο είναι κατάλληλο για διεργασίες ρόφησης όπου η σχετική δραστηριότητα των μορίων ουσίας και υλικού έχει ομοιόμορφο χαρακτήρα και η συσσώρευση στο στερεό γίνεται με αργό ρυθμό (Henry's

region sorption). Επιπλέον περιγράφει επαρκώς το φαινόμενο της απορρόφησης ενώ η αποτελεσματική εφαρμογή του για την προσρόφηση προϋποθέτει χαμηλές συγκεντρώσεις διαλυμένης ουσίας και στερεά χαμηλής προσροφητικής ικανότητας.

Επιπροσθέτως, το μοντέλο *Freundlich* αποτελεί ένα ευρύτερα χρησιμοποιημένο μη γραμμικό μοντέλο ισορροπίας διεργασιών ρόφησης. Η γενική του μορφή είναι η παρακάτω [31]:

$$C_s = K_F C_w^{1/n} \quad (1.2)$$

όπου

- C_s : προσροφημένη ποσότητα, μάζα ανά μονάδα μάζας προσροφητικού υλικού εκφρασμένη σε (mg/kg)
- C_w : διαλυτή ποσότητα, μάζα ανά μονάδα όγκου διαλύματος εκφρασμένη σε (mg/l)
- K_F : είναι ο συντελεστής *Freundlich* και εκφράζει το μέγεθος προσρόφησης, και
- n : συντελεστής έντασης της ρόφησης.

Η τιμή του παράγοντα n στο εκθετικό της εξίσωσης παρέχει σημαντικές πληροφορίες για το φαινόμενο της προσρόφησης. Όταν $1/n < 1$ υποδεικνύεται ότι το φαινόμενο «εξασθενεί» καθώς καλύπτονται σταδιακά οι διαθέσιμες θέσεις. Αντίθετα, όταν $1/n > 1$ υποδηλώνεται ένα είδος «συνεργατικού» μηχανισμού προσρόφησης (cooperative adsorption), με την έννοια ότι η εντεινόμενη επιφανειακή κάλυψη του προσροφητή αυξάνει την «συγγένεια» της ουσίας με το υλικό. Τέλος, όταν η τιμή του εκθέτη είναι κοντά στη μονάδα σημαίνει ότι η διαθεσιμότητα των θέσεων προς κάλυψη από τα μόρια της ουσίας είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση της τελευταίας στο διάλυμα. Εν αντιθέσει με το γραμμικό μοντέλο, το μοντέλο *Freundlich* εφαρμόζεται κυρίως στις περιπτώσεις όπου οι υπό εξέταση ενώσεις βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση στο διάλυμα.

1.9. Δείκτης λιποφιλίας

Ο δείκτης λιποφιλίας K_{ow} (συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού) εκφράζει τον βαθμό υδροφοβίας μίας οργανικής ένωσης. Στην παρούσα εργασία έγινε υπολογισμός των $\log K_{ow}$ για κάθε μία ένωση ξεχωριστά¹. Οι τιμές που προέκυψαν αναγράφονται στον Πίνακα 1.6:

Πίνακας 1.6: Δείκτες λιποφιλίας των τριαζολών

	BZT	TTA	5,6-DM-BZT
$\log K_{ow}$	1,17	1,71	2,26

Από τις παραπάνω τιμές και λαμβάνοντας υπόψη και την δομή των ενώσεων, εύκολα προκύπτει ότι περισσότερο λιπόφιλη είναι η 5,6-διμεθύλο-βενζοτρίαζόλη (5,6-DM-BZT) (διπλά μεθυλιωμένη) ακολουθεί η τολυλτρίαζόλη (TTA) με ένα μεθύλιο και τελευταία είναι η βενζοτρίαζόλη (BZT) η οποία είναι μη μεθυλιωμένη.

1.10. Αποικοδόμηση των τριαζολών

Υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες για την τύχη των βενζοτρίαζολών που απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Η βενζοτρίαζόλη και η τολυλτρίαζόλη αποικοδομούνται εύκολα από την αντίδραση Fenton [32]. Επίσης αποικοδομούνται αργά παρουσία φυτικών οργανισμών ή αποικιών μυκητών *Phanerochaete chrysosporium* [35].

Λόγω της ανθεκτικότητας των βενζοτρίαζολών στην οξείδωση και στην UV ακτινοβολία, σε συνθήκες περιβάλλοντος, οι βενζοτρίαζόλες μπορούν να εμμείνουν στο περιβάλλον για ένα μακροχρόνιο διάστημα. Η βενζοτρίαζόλη αποικοδομείται φωτοχημικά από ακτινοβολία UV. Όμως υψηλές δόσεις ακτινοβολίας οδηγούν σε ενδιαμέσες μορφές προϊόντων τα οποία δίνουν

¹ Πρόγραμμα EPIWIN: Estimations Programs Interface for Windows

αρνητικά αποτελέσματα σε μελέτες τοξικότητας. Η ανιλίνη (aniline), η φαιναζίνη (phenazine) και άλλο ένα άγνωστο προϊόν έχουν ανιχνευτεί σε υδατικά δείγματα μετά από φωτοδιάσπαση της βενζοτριαζόλης.

Σε μια από τις μελέτες των Rollinson και Calley (1986) δεν βρέθηκαν οργανισμοί που θα μπορούσαν να αποικοδομήσουν την βενζοτριαζόλη ως πηγή C και N. Έτσι προέκυψε το συμπέρασμα ότι οι βενζοτριαζόλες δεν είναι βιοαποικοδομήσιμες. Οι μελέτες όμως που αφορούν στην αποικοδόμηση των βενζοτριαζολών και ειδικότερα της BZT και της TTA συνεχίστηκαν κι έχει διερευνηθεί η αποικοδόμηση τους μέσω των μικροβιακών ή χημικών διεργασιών. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν όσον αφορά την αποικοδόμηση των ενώσεων αυτών αναγράφονται στον Πίνακα 1.7:

Πίνακας 1.7:Αποικοδόμηση της βενζοτριαζόλης και της τολυλτριαζόλης [33].

	Βενζοτριαζόλη (BZT)	Τολυλτριαζόλη (TTA)
Φωτοδιάσπαση ($T_{1/2}$)	10,7 μέρες	3,9 μέρες
Υδρόλυση	$pK_a=8,2$	Μη διαθέσιμα στοιχεία
Βιοαποικοδόμηση	90% μετά από 28 ημέρες	77% μετά από 28 ημέρες

Η TTA αποτελείται από ένα μείγμα δύο ισομερών, της 4-μέθυλο-βενζοτριαζόλης (4-methyl-benzotriazole: 4-MeBT) και της 5-μέθυλο-βενζοτριαζόλης (5-methyl-benzotriazole: 5-MeBT). Από μελέτες προκύπτει ότι σε αερόβιες συνθήκες, η 5-MeBT είναι περισσότερο βιοαποικοδομήσιμη από τη 4-MeBT η οποία είναι πιο ανθεκτική. Στην πραγματικότητα όμως όταν μελετάται η βιοαποικοδόμηση των αντιψυκτικών υγρών και της γλυκόλης, η TTA μελετάται σαν μία ένωση χωρίς να λαμβάνεται υπόψη το κάθε ισομερές ξεχωριστά [34].

Θέλοντας να μελετήσουμε ξεχωριστά την αερόβια και αβιοτική αποικοδόμηση των τριαζολών, προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

Αερόβια:

- Η βενζοτρίαζόλη υποκινεί την δέσμευση οξυγόνου τριών μικροοργανισμών σε υγρά απόβλητα, αλλά κάποιοι από αυτούς ξεκινάνε τον μεταβολισμό κάπως καθυστερημένα.

- Η ουσιαστική αποικοδόμηση ξεκινάει μετά από 24 ώρες.

- Η βενζοτρίαζόλη θεωρείται βιολογικά σταθερή όταν λειτουργεί σαν πηγή οργανικού άνθρακα στην ενεργό ιλύ [35].

Αβιοτική αποικοδόμηση - Φωτοαποικοδόμηση:

- Η βενζοτρίαζόλη διασπάται από τις φωτοχημικά παραγόμενες ρίζες υδροξυλίου.

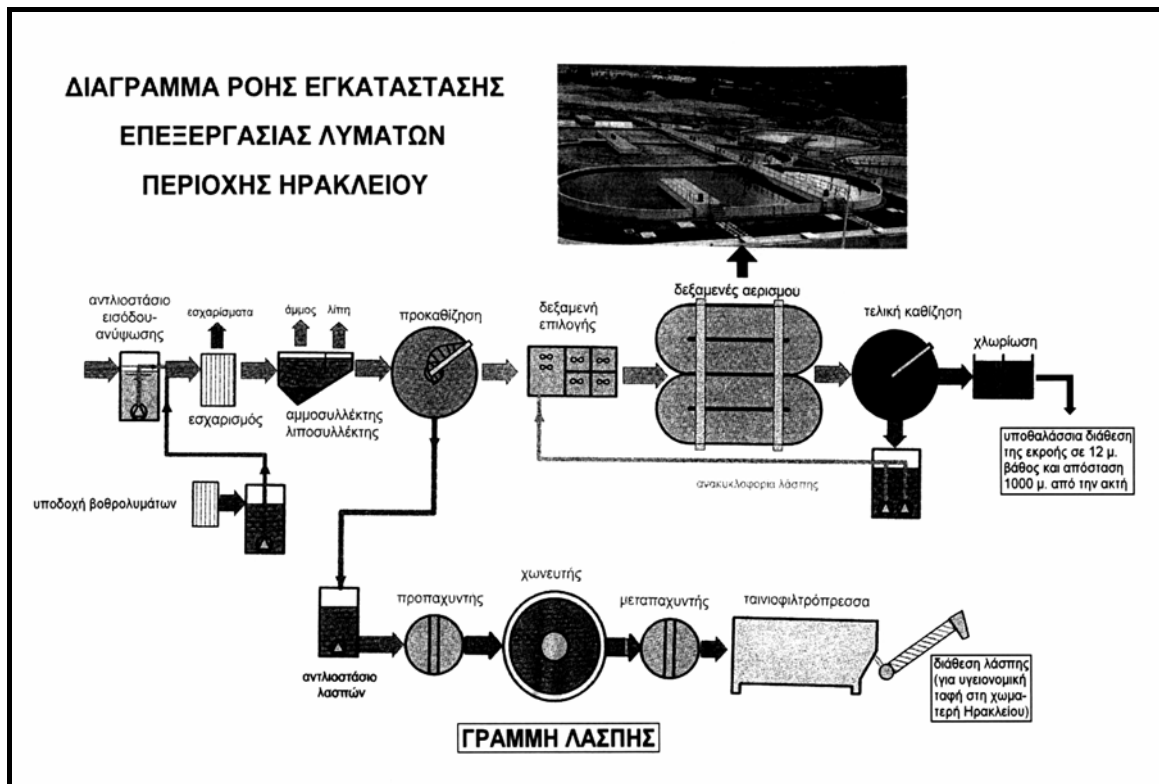
- Η βενζοτρίαζόλη (pKa 8.2) θα βρίσκεται σε μερικώς πρωτονιωμένη μορφή σε περιβαλλοντικές συνθήκες (pH= 7-9) [36]. Δεν αναμένεται να υφίσταται υδρόλυση στο περιβάλλον, μιας και δεν διαθέτει ομάδες που να μπορούν να υποστούν υδρόλυση.

- Η βενζοτρίαζόλη φωτολύεται (300 nm) οδηγώντας σε ανιλίνη (aniline) και σε ανισιδίνη (o-anisidine).

1.11. Διαδικασία επεξεργασίας λυμάτων στον βιολογικό σταθμό Ηρακλείου

Ο βιολογικός σταθμός επεξεργασίας λυμάτων Ηρακλείου είναι κατασκευασμένος για να δεχθεί τα λύματα και τα βοθρολύματα της ευρύτερης περιοχής των Δήμων Ηρακλείου, Ν.Αλικαρνασσού και Γαζίου. Μπορεί να επεξεργασθεί τα λύματα 164.000 ισοδύναμων κατοίκων (λύματα 30.500 m³/day και βοθρολύματα 3.000 m³/day). Στον σταθμό αυτό παραλαμβάνονται λύματα μέχρι 9000 m³/day και βοθρολύματα μέχρι 1.500 m³/day.

Οι βασικότερες διεργασίες επεξεργασίας των λυμάτων, παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.7:



Σχήμα 1.7: Σχεδιάγραμμα εγκατάστασης του Βιολογικού καθαρισμού

Οι διεργασίες αυτές αναπτύσσονται ακολούθως:

1. Προεπεξεργασία

Τα αστικά υγρά απόβλητα, εισέρχονται στην εγκατάσταση επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, και με την χρήση αντλιοστασίου που αποτελείται από έξι υποβρύχιες αντλίες παροχής $835 \text{ m}^3/\text{h}$ η καθεμία, οδηγούνται στη γραμμή προεπεξεργασίας η οποία περιλαμβάνει διαδοχικά:

- **Σχάρισμα:** Τρεις αυτοκαθαριζόμενες ημικυκλικές μηχανικές σχάρες (παροχής $1.800 \text{ m}^3/\text{h}$ η καθεμία με διάκενα 19 mm) απομακρύνουν τα χονδρά στερεά με τον εσχαρισμό των λυμάτων.
- **Αμμοσυλλογή - Λιποσυλλογή:** Αποτελείται από δύο παράλληλες υπομονάδες εξοπλισμένες με διαχυτήρες αέρα και κινούμενες γέφυρες και στοχεύει στην απομάκρυνση σωματιδίων διαμέτρου μεγαλύτερων από $200 \mu\text{m}$ και στην απομάκρυνση λιπών.

- **Εξισορρόπηση παροχής:** Αποτελείται από δύο παράλληλες υπομονάδες, εξοπλισμένες με διάταξη υπερήχων για τη μέτρηση της παροχής λυμάτων (Δίαυλος Parshall).

2. Πρωτοβάθμια επεξεργασία

Αφού διέλθουν από διάυλο Parshall οδηγούνται σε δεξαμενές πρωτοβάθμιας καθίζησης με σκοπό:

- την απομάκρυνση των αιωρούμενων στερεών μεγέθους από 1-100 μm και
- τη μείωση του βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου (BOD_5)

Η απομάκρυνση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση του οργανικού φορτίου αφού τα αιωρούμενα στερεά περιέχουν οργανικές ενώσεις. Τυπικά, οι δεξαμενές πρωτοβάθμιας καθίζησης αφαιρούν το 50-70 % των αιωρούμενων στερεών και το 25-40% του BOD_5 .

3. Δευτεροβάθμια επεξεργασία

Τα λύματα τα οποία εξέρχονται από την πρωτοβάθμια καθίζηση εξακολουθούν να έχουν διαλυμένα οργανικά. Προκειμένου να αποδομηθούν τα οργανικά αυτά χρησιμοποιούνται βιολογικές διεργασίες. Έτσι επιτυγχάνεται η οξείδωση τους από αερόβιους μικροοργανισμούς. Οι πιο συνηθισμένες διεργασίες είναι οι μικροβιακές διεργασίες σε αιώρημα, κυρίως η διεργασία ενεργού ιλύος. Η διεργασία της ενεργού ιλύος περιλαμβάνει την δεξαμενή επιλογής, την δεξαμενή αερισμού και την δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης. Πιο αναλυτικά:

Στην **δεξαμενή επιλογής** η ανακυκλοφορούσα λάσπη από τις δεξαμενές δευτεροβάθμιας καθίζησης αναμιγνύεται με τα λύματα που προέρχονται από την πρωτοβάθμια καθίζηση. Στην δεξαμενή αυτή υπάρχει συνεχής ανάμιξη των λυμάτων με έξι υποβρύχιους αναμικτήρες με χρόνο παραμονής τουλάχιστον μία ώρα. Στην δεξαμενή επιλογής παρεμποδίζεται η διόγκωση του ιζήματος από νηματοειδείς μικροοργανισμούς που θα ελαττώσουν την πυκνότητα του κροκκιδώματος και γίνεται τροφοδοσία των

λυμάτων με επί πλέον βιομάζα που θα χρειασθεί στην δεξαμενή αερισμού. Εδώ ο λόγος F/m (Food/Microorganism) είναι μεγάλος ενώ στην δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης ο λόγος είναι μικρός.

Στην **δεξαμενή αερισμού** γίνεται η βιολογική οξείδωση των οργανικών ενώσεων από τους μικροοργανισμούς. Η βιολογική οξείδωση οδηγεί σε ανάπτυξη μικροοργανισμών και παραγωγή νέων κυττάρων και μεταβολικών προϊόντων όπως CO_2 , NO_3^- , και SO_4^{2-} . Οι μικροοργανισμοί παράγουν λιποπλυσακχαρίτες και άλλες ουσίες που προκαλούν τη συσσωμάτωση τους σε κροκίδες (flocs) που αποτελούν την ενεργό ιλύ. Η ιλύς αυτή απορροφά τα διαλυμένα και αιωρούμενα οργανικά και ανόργανα στερεά τα οποία και οξειδώνει βιολογικά. Η παροχή αερισμού επίσης εξασφαλίζει και την καλή ανάμιξη του υγρού.

Η νιτροποίηση (βιολογική οξείδωση της NH_3 , NH_4^+ σε NO_3^-) και η απονιτροποίηση (βιολογική αναπαραγωγή των NO_3^- σε N_2) επιτυγχάνονται με εναλλασσόμενη οξική και ανοξική λειτουργία των δεξαμενών αερισμού. Το οξυγόνο στις δεξαμενές αερισμού παρέχεται με διαχυτήρες (περιστρεφόμενοι ρότορες).

Στην **δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης** γίνεται διαχωρισμός της ενεργού ιλύς από το νερό με όσον το δυνατόν καλύτερη διαύγαση και πύκνωση της λάσπης. Η καθιζάνουσα λάσπη οδηγείται στην δεξαμενή επιλογής όπου αναμιγνύεται με τα λύματα που προέρχονται από την πρωτοβάθμια καθίζηση και στη συνέχεια μεταφέρεται και πάλι στη δεξαμενή αερισμού, ενώ η περίσσεια οδηγείται προς την γραμμή επεξεργασίας λάσπης. Οι δεξαμενές δευτεροβάθμιας καθίζησης είναι δύο, διαμέτρου 38 m και με περιστρεφόμενα ξέστρα.

Στο **σύστημα απολύμανσης** στο οποίο οδηγείται η εκροή από τη δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης. Με χλωρίωση καταστρέφονται οι παθογόνοι μικροοργανισμοί πριν την τελική κατάληξη των επεξεργασμένων λυμάτων στη θάλασσα.

4. Επεξεργασία της παραγόμενης λάσπης

Οι πηγές λάσπης περιλαμβάνουν τα εσχαρίσματα, την αμμοσυλλογή, την λάσπη από την πρωτοβάθμια και δευτεροβάθμια καθίζηση. Προκειμένου να διατεθεί, απαιτείται μείωση οργανικού φορτίου και καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών που περιέχει. Οι διεργασίες επεξεργασίας της λάσπης σε γενικές γραμμές περιλαμβάνουν:

- Την συμπύκνωση (απομάκρυνση του νερού που περιέχει) η οποία επιτυγχάνεται με βαρύτητα.
- Την σταθεροποίηση (καταστροφή οργανισμών, μείωση στερεών και οργανικού φορτίου) η οποία επιτυγχάνεται με αναερόβια χώνευση σε δεξαμενές που είναι εξοπλισμένες με μηχανικό αναδευτήρα και σύστημα θέρμανσης της λάσπης.
- Την αφυδάτωση μέχρι περιεκτικότητας σε στερεά 25% η οποία επιτυγχάνεται με ταινιοφιλτροπρέσες.

2. Πειραματικό μέρος

Η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των τριαζολών στα περιβαλλοντικά δείγματα, οι μικρές συγκεντρώσεις τους σε αυτά, ο διαχωρισμός τους από ένα πλήθος οργανικών ενώσεων που θα παρεμπόδιζαν την ανάλυση και τον ακριβή προσδιορισμό τους, κατέστησε αναγκαία την ανάπτυξη μιας τεχνικής η οποία να διαθέτει μεγάλη διαχωριστική ικανότητα, υψηλό ποσοστό ανάκτησης, χαμηλό όριο ανίχνευσης, αλλά και να είναι ικανή να πραγματοποιείται η ανάλυση σε όσο το δυνατόν συντομότερο χρόνο. Οι τεχνικές εκχύλισης, διαχωρισμού και ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία περιγράφονται παρακάτω.

2.1. Οργανολογία

2.1.1. Εκχύλιση στερεάς φάσης

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (*Solid Phase Extraction: SPE*) αποτελεί μία από τις συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους προεπεξεργασίας δειγμάτων με την οποία επιτυγχάνεται συμπύκνωση και καθαρισμός των υπό μελέτη ουσιών. Καθώς το δείγμα διέρχεται από την κατασκευή, συνήθως μικροφυσίγγιο (*cartridge*), η οποία φέρει το προσροφητικό στερεό υλικό κατακρατούνται οι υπό ανάλυση ενώσεις, ενώ απομακρύνονται οι ανεπιθύμητες.

Το είδος των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται εξαρτάται από τις ιδιότητες των δραστικών ομάδων που χαρακτηρίζει την διεργασία της εκχύλισης. Έτσι, ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά την κατακράτηση της ουσίας, μπορεί να είναι:

- Ανάστροφης φάσης, που αφορά «μετάβαση» οργανικών διαλυτών ενώσεων από μία πολική κινητή φάση σε μία μη πολική.

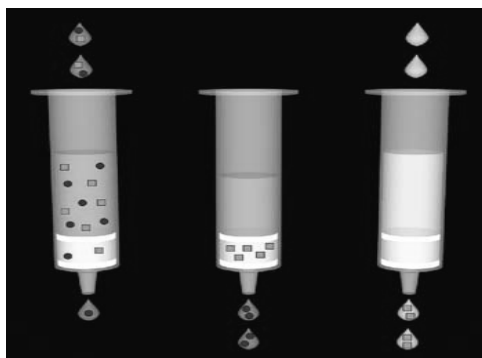
- Κανονικής φάσης, που αφορά δέσμευση της ουσίας από μία πολική επιφάνεια.
- Ιονανταλλαγής, στην περίπτωση που πραγματοποιείται ανταλλαγή ιόντων μεταξύ διαλύματος και προσροφητικού υλικού.

Τα πλεονεκτήματα της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) περιλαμβάνουν υψηλές ανακτήσεις, καθαρά εκχυλίσματα, συμβατότητα με την χρωματογραφική ανάλυση και ελαχιστοποίηση στην κατανάλωση οργανικών διαλυτών.

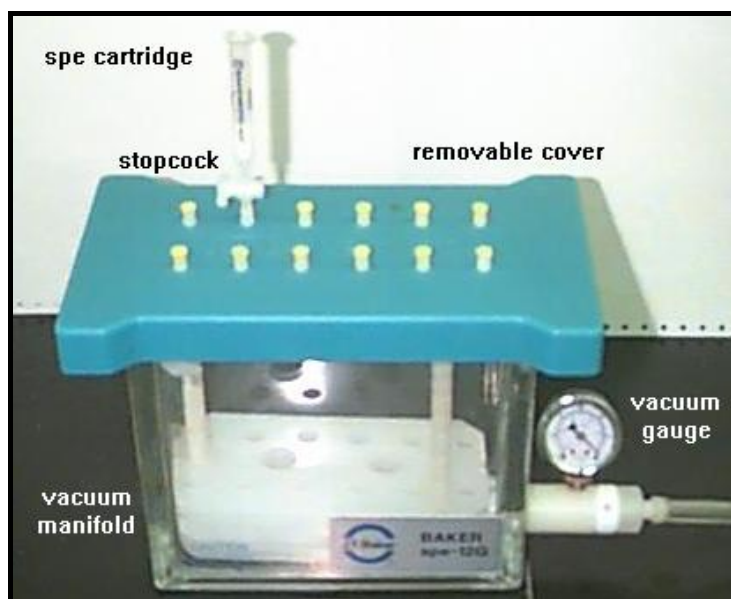
Για την εφαρμογή εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) ακολουθούνται τα ακόλουθα βήματα:

1. Ενεργοποίηση των δραστικών ομάδων του προσροφητικού υλικού με διέλευση κατάλληλου διαλύτη.
2. Διέλευση του δείγματος από τη στήλη κατά την οποία κατακρατείται η επιθυμητή ουσία.
3. Έκπλυση του cartridge με διαλύτη για την απομάκρυνση τυχόντων προσμίξεων στο προσροφητικό υλικό.
4. Έκλυση της υπό μελέτη ουσίας με κατάλληλο εκλεκτικό διαλύτη. Γίνεται με χρήση διαλύτη ο οποίος συμβάλλει στο σπάσιμο δεσμών που συγκρατούν την επιθυμητή ουσία με το προσροφητικό υλικό με όσο το δυνατόν μικρότερη απομάκρυνση των υπολοίπων.

Η διαδικασία καθώς και η διάταξη που χρησιμοποιείται κατά την εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) απεικονίζονται στα Σχήματα 2.1 και 2.2 αντίστοιχα:

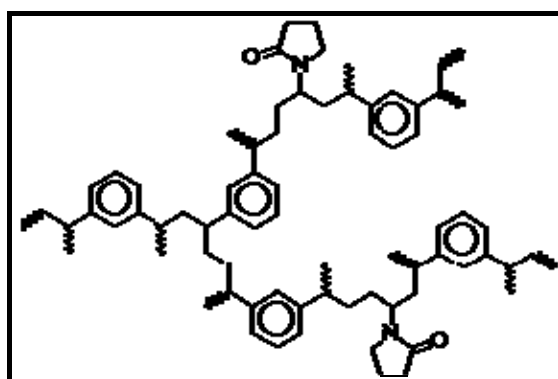


Σχήμα 2.1: Διαδικασία εκχύλισης στερεάς φάσης [37].



Σχήμα 2.2: Συσκευή για εκχύλιση στερεάς φάσης (manifold) [38].

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου έγκειται στις αλληλεπιδράσεις της ουσίας με το προσροφητικό υλικό. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα Waters Oasis HLB (Hydrophilic - Lipophilic Balance): 3 cc (60 mg) Extraction Cartridges. Το προσροφητικό υλικό στην περίπτωση αυτή αποτελείται από το συμπολυμερές [poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone)], η δομή του οποίου φαίνεται στο Σχήμα 2.3:



Σχήμα 2.3: Δομή προσροφητικού υλικού των cartridges (Waters Oasis HLB) [39].

Το συμπολυμερές αυτό, όπως φαίνεται κι από την δομή του, διαθέτει τόσο υδρόφιλες όσο και λιπόφιλες ομάδες. Έτσι, οι προς προσρόφηση ενώσεις προσανατολίζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να προσδεθούν οι ομάδες τους με τις

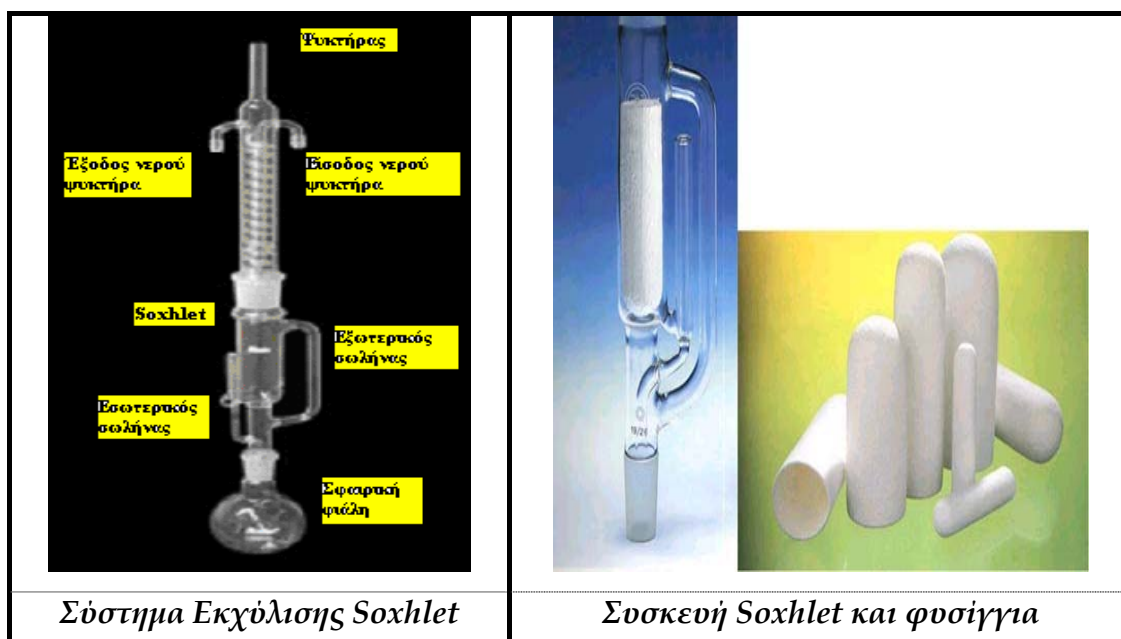
ομόλογες του προσροφητικού. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανάστροφης φάσης λειτουργία (reversed action) του προσροφητικού αυτού υλικού οφείλεται στην παρουσία των εξαμελών δακτυλίων. Η καινοτομία των συγκεκριμένων μικροφυσίγγων βασίζεται στο ότι το προσροφητικό αυτό στηρίζει την δράση του στις ιδιότητες του πολυμερούς [poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone)], ενώ τα μικροφυσίγγια που χρησιμοποιούνται συνήθως διαθέτουν χημικά τροποποιημένη silica στην οποία έχει προσδεθεί μια C18 αλυσίδα ή κάποιο άλλο υδρόφοβο αλκάλιο.

2.1.2. Εκχύλιση με συσκευή Soxhlet

Πρόκειται για μια τεχνική συνεχούς εκχυλίσεως, και το σύστημα το οποίο χρησιμοποιείται απεικονίζεται στο Σχήμα 2.4. Κατά την εκχύλιση Soxhlet, οι βασικότερες διεργασίες που λαμβάνουν χώρα περιγράφονται συνοπτικά ακολούθως:

1. Ο διαλύτης στην σφαιρική φιάλη θερμαίνεται με την βοήθεια θερμαντικής πηγής με σκοπό το σύστημα να γίνει κορεσμένο σε ατμούς του διαλύτη.
2. Οι ατμοί αυτοί οδηγούνται μέσω του ενός από τους δύο σωλήνες (εξωτερικός) που διαθέτει η συσκευή Soxhlet προς το υπόλοιπο σύστημα, και προφανώς και προς τον ψυκτήρα ο οποίος έχει εφαρμοστεί στο πάνω άκρο της συσκευής.
3. Οι ατμοί αυτοί υγροποιούνται και οδηγούνται στον χώρο της soxhlet όπου περιέχεται το δείγμα τοποθετημένο μέσα σε ειδικό φυσίγγιο (thimble).
4. Στο στάδιο αυτό ο διαλύτης έρχεται σε επαφή, μέσω του ειδικού φυσίγγιου, με το δείγμα. Ο διαλύτης εξάγει έτσι τις ενώσεις που μας ενδιαφέρουν αφήνοντας το στερεό δείγμα μέσα στο φυσίγγιο. Η εκχύλιση αυτή αποδεικνύεται από την αλλαγή χρώματος του διαλύτη σε σχέση με αυτόν που περιέχεται στην σφαιρική φιάλη.
5. Ο όγκος του διαλύτη αυξάνει στον χώρο της Soxhlet όπου περιέχεται το δείγμα με την πάροδο του χρόνου.

6. Λόγω της ανόδου της στάθμης του διαλύτη (στον οποίο περιέχονται οι εκχυλιζόμενες ουσίες), αναγκάζεται μέσω του μικρού εσωτερικού σωλήνα να ακολουθήσει μία διαδικασία αναρρόφησης και να οδηγηθεί τελικά στην σφαιρική φιάλη. Με τον τρόπο αυτό οι εκχυλισμένες ενώσεις οδηγούνται στην σφαιρική φιάλη ενώ ο χώρος όπου περιέχεται το δείγμα μένει χωρίς διαλύτη.
7. Τα στάδια που προαναφέρθηκαν επαναλαμβάνονται για όσο χρόνο παρέχουμε θερμότητα στην σφαιρική φιάλη. Ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι ο διαλύτης κάθε φορά που ανανεώνεται στον χώρο της Soxhlet λαμβάνει της ενώσεις μας και τις οδηγεί τελικά στην σφαιρική φιάλη.
8. Κάθε φορά που επαναλαμβάνεται η διαδικασία, το διάλυμα στην σφαιρική φιάλη γίνεται πιο πλούσιο σε συγκέντρωση των ουσιών, μιας κι αυτές δεν ακολουθούν την πορεία του διαλύτη.
9. Η εκχύλιση Soxhlet ή συνεχής εκχύλιση θεωρείται ολοκληρωμένη όταν ο διαλύτης έχει το ίδιο χρώμα τόσο στην αίθουσα όπου περιέχεται το δείγμα όσο και όταν ήταν καθαρός. Αυτό σημαίνει ότι το δείγμα δεν διαθέτει πλέον άλλη ποσότητα ουσίας και γι' αυτό ο διαλύτης παραμένει άχρωμος.



Σχήμα 2.4: Σύστημα και συσκευή εκχύλισης Soxhlet [40 - 41].

2.1.3. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC: High Performance Liquid Chromatography) χρησιμοποιείται ευρύτατα στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση κυρίως για την ανίχνευση, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό οργανικών ουσιών σε πολύπλοκα δείγματα.

Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής αυτής βασίζεται στον διαφορετικό βαθμό κατανομής των συστατικών ενός δείγματος μεταξύ μιας κινητής φάσης η οποία είναι ένα υγρό και μιας στατικής φάσης η οποία είναι καθηλωμένη σε μια στήλη στην οποία οι προς ανάλυση ουσίες αναγκάζονται να κινηθούν κάτω από υψηλή πίεση. Ο διαχωρισμός γίνεται στην στήλη και το ποσοστό του διαχωρισμού εξαρτάται από το μέγεθος της αλληλεπίδρασης μεταξύ των υπό διαχωρισμό συστατικών, και της κινητής και στατικής φάσης.

Οι διαφορές στην ευκινησία των συστατικών του δείγματος, λόγω της διαφορετικής ισχύος κατακράτησης από την στερεά φάση (που οφείλεται στην κατάλληλη ισορροπία των ενδομοριακών δυνάμεων μεταξύ των τριών δραστικών παραγόντων, δηλαδή της διαλυμένης ουσίας, της κινητής φάσης και της στατικής φάσης) έχει σαν αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους, καταλαμβάνοντας διαφορετικές ζώνες και στην συνέχεια τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Ο αριθμός των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του δείγματος και της στερεάς φάσης διευκολύνει την εκλεκτικότητα της, δηλαδή τον βαθμό στον οποίο η συγκεκριμένη τεχνική μπορεί να διαχωρίσει τις προς ανάλυση ουσίες από τις αλληλεπιδράσεις στο αρχικό δείγμα.

Ο τύπος χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν χρωματογραφία κατανομής αντίστροφης φάσης (*Reversed-Phase Chromatography*). Στην χρωματογραφία αντίστροφης φάσης η στατική φάση είναι μία μη πολική (υδρόφοβη), ενώ η κινητή φάση είναι ένας πολικός διαλύτης. Στην

περίπτωση αυτή το πολικότερο συστατικό εμφανίζεται πρώτο και με αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης αυξάνει ο χρόνος έκλουσης.

Η κατακράτηση μιας ένωσης σε μία αντίστροφης φάσης χρωματογραφική στήλη καθορίζεται από την πολικότητα της ένωσης και τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες που εφαρμόζονται, όπως είναι οι ακόλουθες:

- σύσταση της κινητής φάσης
- είδος πληρωτικού υλικού
- θερμοκρασία

Η πολικότητα του υγρού έκλουσης παίζει τον μεγαλύτερο ρόλο σε όλους τους τύπους HPLC. Ο συντελεστής κατακράτησης k' είναι ο περισσότερο ελεγχόμενος πειραματικά, λόγω της ισχυρής εξάρτησης του από την σύσταση της κινητής φάσης. Μερικές φορές όμως ρύθμιση του παράγοντα k' δεν επαρκεί για να δώσει διακριτές κορυφές χωρίς επικαλύψεις και τότε πρέπει να μεταβληθεί ο συντελεστής εκλεκτικότητας α με την αλλαγή σύνθεσης της κινητής φάσης.

Υπάρχουν δύο τύποι έκλουσης: Η *ισοκρατική (isocratic elution)* και η *βαθμιδωτή έκλουση (gradient elution)*. Στην πρώτη περίπτωση αντλείται σταθερή σύσταση διαλύτη (κινητής φάσης) μέσω της στήλης κατά την διάρκεια της ανάλυσης. Στην δεύτερη περίπτωση, η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται σύμφωνα με το πρόγραμμα της ανάλυσης.

Η συσκευή HPLC αποτελείται από τα εξής επιμέρους τμήματα:

1. Σύστημα παροχής κινητής φάσης.

Πρόκειται για ένα σύστημα αντλιών με δυνατότητα ισοκρατικής και βαθμιδωτής έκλουσης, και η λειτουργία του εξαρτάται από το πρόγραμμα (λογισμικό) που χρησιμοποιείται για την παροχή κινητής φάσης. Στην παρούσα εργασία σαν εκλουστικό μέσο χρησιμοποιήθηκαν μεθανόλη και απιονισμένο νερό (με 0.2% οξικό οξύ) ενώ η έκλουση που πραγματοποιήθηκε ήταν βαθμιδωτή.

2. Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector)

Αποτελείται από μια περιστρεφόμενη βαλβίδα υψηλής πίεσης με βρόχο δείγματος 20μl. Στο σύστημα εισάγονται μικροί όγκοι δείγματος (με μικροσύριγγα) με μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα.

3. Τμήμα στήλης

Η στήλη διαχωρισμού είναι ένας ευθύγραμμος σωλήνας κατασκευασμένος από χάλυβα. Περιέχει τη στατική φάση η οποία είναι μη πολική και αποτελείται από silica (σαν υπόστρωμα) στην οποία έχει προσδεθεί με χημικό δεσμό υδρογονανθρακική αλυσίδα C-18.

Για τις αναλύσεις της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε ευθύγραμμη στήλη κατασκευασμένη από ανοξείδωτο χάλυβα MZ-PAH C-18 αντίστροφης φάσης μήκους 25 cm, εσωτερικής διαμέτρου 4,0 mm με υλικό πλήρωσης που αποτελείται από πορώδη σωματίδια λεπτότατου διαμερισμού (μέγεθος 5 μm) και υψηλής σφαιρικής ομοιομορφίας. Η θερμοκρασία της στήλης σε όλη την διάρκεια της ανάλυσης ήταν 45 °C.

4. Σύστημα ανίχνευσης

Με τον ανιχνευτή γίνεται φανερή η παρουσία καθενός από τα συστατικά του μίγματος τα οποία εξέρχονται από τη στήλη και μετρείται η ποσότητα ή η συγκέντρωσή τους μέσα στην κινητή φάση. Οι ανιχνευτές θα πρέπει να έχουν μεγάλη ευαισθησία, σταθερότητα και αναπαραγωγιμότητα, σύντομους χρόνους απόκρισης, παρόμοια απόκριση προς όλες τις προς διαχωρισμό ουσίες και τον ελάχιστο δυνατό εσωτερικό όγκο για τον περιορισμό της διεύρυνσης των κορυφών. Ο νεκρός όγκος του ανιχνευτή δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος από το ένα δέκατο του όγκου της κορυφής έκλουσης.

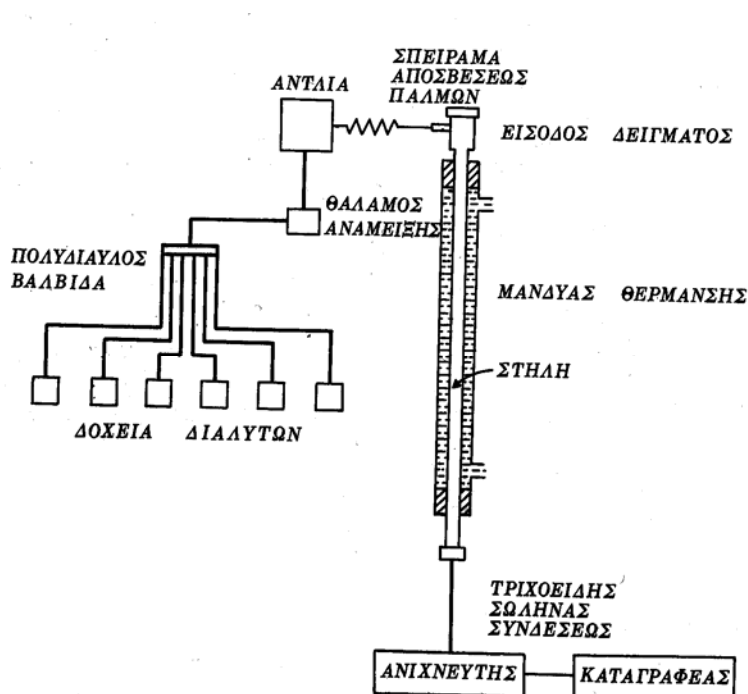
Το σύστημα ανίχνευσης που εφαρμόστηκε στην μελέτη αυτή ήταν συστοιχίες φωτοδιόδων (photodiode-PDA) και είναι ουσιαστικά ένα φασματοφωτόμετρο που μετρά την απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας σε σταθερό ή μεταβαλλόμενο μήκος κύματος. Το μήκος κύματος που επιλέχθηκε για όλες τις τριαζόλες ήταν τα 260 nm, μιας και σ' αυτό το μήκος κύματος λαμβάνουμε

το βέλτιστο σήμα έντασης και αποφεύγονται παρεμποδίσεις από άλλες ενώσεις.

5. Τμήμα καταγραφικού

Αποτελεί το μέσο συλλογής, αποθήκευσης, επεξεργασίας και παρουσίασης των αποτελεσμάτων της ανάλυσης (χρωματογράφημα, χρόνοι έκλυσης κ.α.). Τις λειτουργίες αυτές εκτελεί ηλεκτρονικός υπολογιστής παράλληλα με τον έλεγχο της παροχής κινητής φάσης και εισαγωγής δείγματος.

Στο Σχήμα 2.5 παρουσιάζονται τα σημαντικότερα τμήματα από τα οποία αποτελείται μια διάταξη HPLC.



Σχήμα 2.5: Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (H.P.L.C.) [42].

2.1.4. Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης - Ηλεκτροπυροκαυσμού - Διαδοχικής Φασματομετρίας Μαζών.

Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) που χρησιμοποιείται σε αυτή την εργασία είναι της κατασκευάστριας εταιρείας

Thermo Finnigan (San Jose, USA). Το σύστημα αυτό αποτελείται από μια αντλία (HPLC Pump) και έναν αυτόματο δειγματολήπτη (Surveyor AS, Thermo Finnigan). Η ανάλυση των συστατικών του δείγματος γίνεται με υγρή χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως (reversed phase) σε αναλυτική στήλη C-18, στους 45 °C με μια ταχύτητα ροής 800 μl/min και ο εισαγόμενος όγκος του δείγματος επιλέχθηκε στα 20 μl. Για την ανάλυση των δειγμάτων επιλέχθηκε η αναλυτική στήλη MZ-PAH C-18 αντίστροφης φάσης μήκους 25 cm, εσωτερικής διαμέτρου 4,0 mm, με υλικό πλήρωσης που αποτελείται από πορώδη σωματίδια λεπτότατου διαμερισμού (μέγεθος 5 μm). Η έκλουση των συστατικών του δείγματος από την αναλυτική στήλη πραγματοποιείται με βαθμιδωτή έκλουση, με χρήση μεθανόλης και απιονισμένου νερού (0,2% οξικό οξύ). Το πρόγραμμα της βαθμιδωτής έκλουσης που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία αναφέρεται εκτενώς παρακάτω (πειραματικό μέρος).

Για την επίτευξη μέγιστης ευαισθησίας στο φασματομέτρο μάζας, μετά την έκλουση των συστατικών του δείγματος από την αναλυτική στήλη και πριν την εισαγωγή τους στο σύστημα ηλεκτροψεκασμού παρεμβάλλεται ένας διακλαδωτής ροής (*post-column flow-splitting device*). Ο διακλαδωτής αυτός είναι ένα βοηθητικό εξάρτημα, σύνδεσμος σε Σχήμα T, που επιτρέπει στο 28,7 % του εκλούσματος να συνεχίσει τη ροή του προς το σύστημα του ηλεκτροψεκασμού με ροή 230 μl/min, ενώ το υπόλοιπο μέρος καταλήγει στα απόβλητα. Αυτό συμβαίνει γιατί η ταχύτητα ροής του δείγματος επηρεάζει την αποδοτικότητα του ηλεκτροψεκασμού. Πιο συγκεκριμένα, μικρές ταχύτητες ροής βελτιώνουν την ποιότητα του σήματος και την απόδοση του ηλεκτροψεκασμού, με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου φασματομετρίας μάζας [43].

Η εισαγωγή όλων των προτύπων διαλυμάτων και των δειγμάτων στη χρωματογραφική στήλη γίνεται με τον αυτόματο δειγματολήπτη, που είναι εξοπλισμένος με βαλβίδα 6 εισόδων εισαγωγής δείγματος (Rheodyne), η οποία φέρει βρόγχο εισαγωγής δείγματος (loop) όγκου 20 μl.

Τεχνική Ηλεκτροψεκασμού

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία βασίζεται στην τεχνική του ηλεκτροψεκασμού (electrospray ionization) σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας. Κατά τον ηλεκτροψεκασμό διαλύματος, τα εντός του διαλύματος ιόντα της προσδιοριζόμενης ουσίας μεταβαίνουν στην αέρια κατάσταση. Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση πολικών ενώσεων. Επίσης, καθιστά δυνατή την ανάλυση θερμικά ασταθών ενώσεων ή ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους, οι οποίες παρουσιάζουν προβλήματα στην ανάλυσή τους με τη συνήθη τεχνική της φασματομετρίας μάζας. Η διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού μπορεί να χωριστεί βασικά σε τρία στάδια:

1. Σχηματισμός σταγόνας
2. Συρρίκνωση σταγόνας
3. Παραγωγή ιόντων στην αέρια φάση.

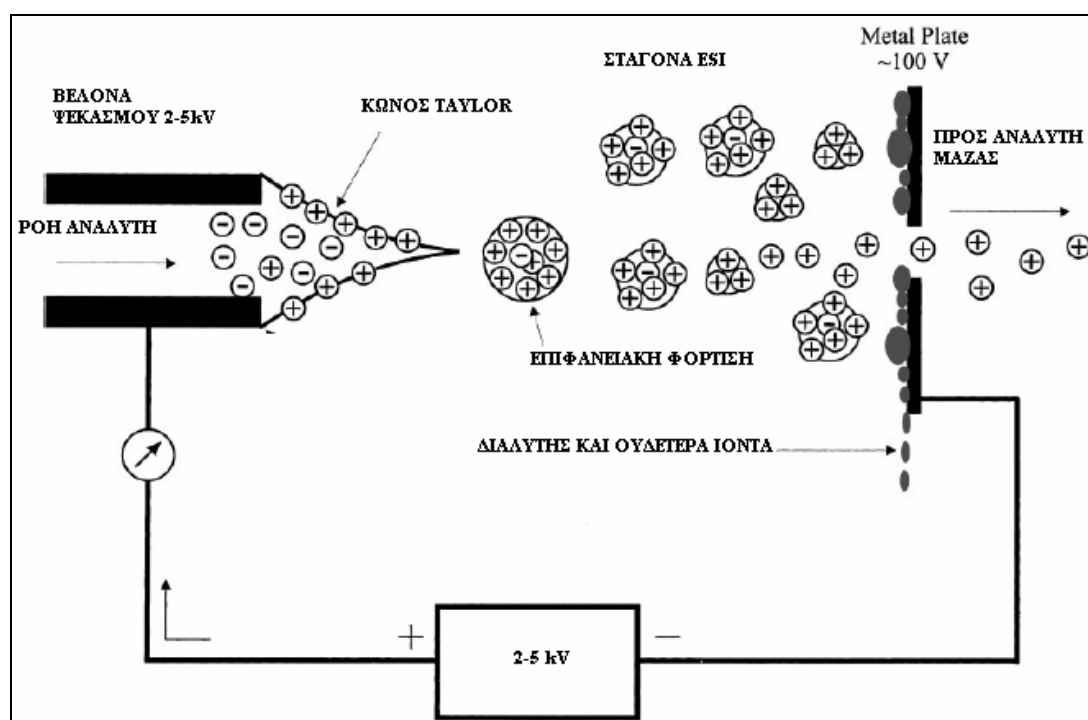
Το διάλυμα της προσδιοριζόμενης ένωσης απελευθερώνεται στην άκρη της βελόνας ηλεκτροψεκασμού, όπου εφαρμόζεται ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο για τη διατήρηση της άκρης της βελόνας ηλεκτροψεκασμού σε αρκούντως υψηλή τάση. Μόλις το διάλυμα «συναντήσει» το ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο σχηματίζει ένα νέφος από σταγόνες ισχυρά φορτισμένες στην επιφάνειά τους. Στην παρούσα εργασία εφαρμόζεται θετικό δυναμικό, έτσι τα εντός του διαλύματος θετικά ιόντα συσσωρεύονται στην επιφάνεια με τέτοιο τρόπο ώστε σχηματίζουν έναν κώνο (Taylor cone). Σε αρκούντως ισχυρό πεδίο, ο κώνος παράγει θετικά φορτισμένες σταγόνες όταν η εφαρμοζόμενη ηλεκτροστατική δύναμη υπερβεί την επιφανειακή τάση του διαλύτη. Η διάμετρος της σταγόνας εξαρτάται από το εφαρμοζόμενο δυναμικό, την ταχύτητα ροής του διαλύματος και τη φύση του διαλύτη.

Καθώς το νέφος από σταγόνες διασχίζει μια βαθμιδωτή μεταβολή της πίεσης προς την κατεύθυνση του αναλυτή μάζας, κατ' αρχάς λαμβάνει χώρα εξάτμιση του διαλύτη από τις αρχικά σχηματιζόμενες σταγόνες, η οποία επιφέρει μια μείωση στη διάμετρο της σταγόνας με ταυτόχρονη αύξηση της

πυκνότητας φορτίου στην επιφάνεια κάθε σταγόνας. Η πυκνότητα φορτίου στην επιφάνεια κάθε σταγόνας αυξάνει συνεχώς μέχρι ενός κρίσιμου σημείου, που είναι γνωστό ως όριο Rayleigh. Στο σημείο αυτό, λαμβάνει χώρα σχάση της σταγόνας (σχάση Coulomb) σε μικρότερα σταγονίδια διότι η ηλεκτροστατική άπωση έχει υπερβεί την επιφανειακή τάση που κρατάει ενωμένη τη σταγόνα. Ακολουθεί περαιτέρω εξάτμιση του διαλύτη και σχάσεις κ.ο.κ., με αποτέλεσμα το σχηματισμό τελικά πολύ μικρών σταγονιδίων από τα οποία εκτινάσσονται τα ιόντα της εξεταζόμενης ένωσης στην αέρια κατάσταση λόγω της ηλεκτροστατικής άπωσης.

Για την ευκολότερη εκνέφωση του διαλύματος καθώς αυτό εξέρχεται από τη βελόνα ηλεκτροψεκασμού, συνήθως διαβιβάζεται ένα αέριο εκνέφωσης (sheath gas). Παράλληλα, το αέριο αυτό διευκολύνει και την εξάτμιση του διαλύτη από τις σταγόνες (auxiliary gas).

Στο Σχήμα 2.6 παρουσιάζονται τα σπουδαιότερα φαινόμενα τα οποία λαμβάνουν χώρα κατά τον ηλεκτροψεκασμό διαλύματος. Ενώ στο Σχήμα 2.7 παρουσιάζεται η συσκευή ηλεκτροψεκασμού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.



Σχήμα 2.6: Σχηματισμός σταγόνων διαλύματος κατά τον ηλεκτροψεκασμό [44].



Σχήμα 2.7: Συσκευή ηλεκτροψεκασμού [45].

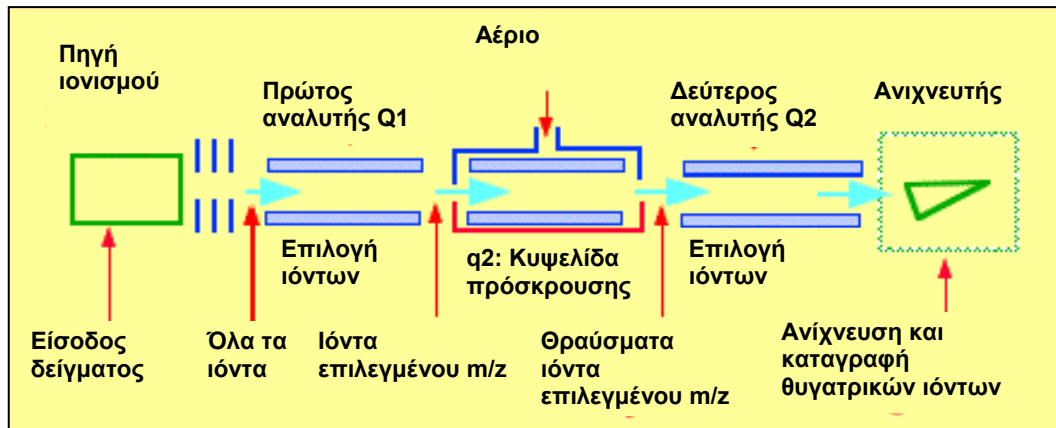
Στην προκειμένη περίπτωση, ως αέριο ξήρανσης (βοηθητικό αέριο, auxiliary gas) καθώς και ως αέριο εκνέφωσης (sheath gas) χρησιμοποιήθηκε άζωτο υψηλής καθαρότητας 99% που παράγεται από μια γεννήτρια αζώτου. Στη γεννήτρια αζώτου παρέχεται αέρας από έναν αεροσυμπιεστή (compressor) όπου διατηρείται ο αέρας υπό ατμοσφαιρική πίεση. Η πίεση του αερίου εκνέφωσης έχει επιλεγεί στην τιμή των 45 μονάδων και του βοηθητικού αερίου στην τιμή των 10 μονάδων (πρόκειται για μονάδες οι οποίες έχουν οριστεί από τον κατασκευαστή).

Στα υπόλοιπα τμήματα εφαρμόζεται θετική πολικότητα (θετικά ιόντα), ενώ το εφαρμοζόμενο δυναμικό στη βελόνα ηλεκτροψεκασμού (spray voltage) αντιστοιχεί στην τιμή των 5000 Volt. Τέλος, η θερμοκρασία στον θερμαινόμενο τριχοειδή (capillary temperature) ρυθμίζεται στους 300 °C.

Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας

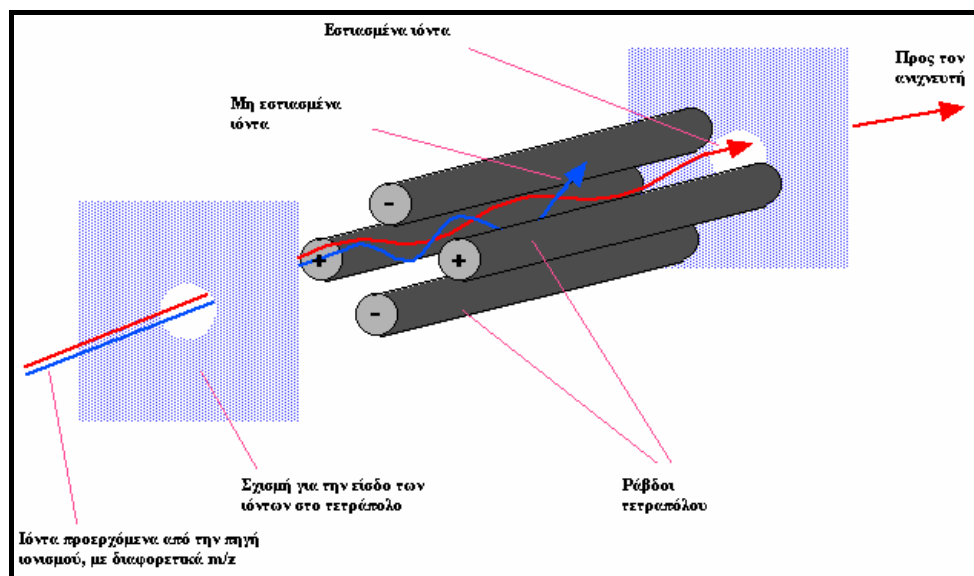
Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας είναι συνδυασμένο με ένα φασματόμετρο μάζας, που φέρει αναλυτή μάζας με τρία τετράπολα (TSQ Quantum, Thermo Finnigan). Πρόκειται για μια διάταξη από τρία τετράπολα

όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.8, με την διαφορά ότι δεν είναι γραμμική αλλά η κυψελίδα πρόσκρουσης σχηματίζει γωνία.



Σχήμα 2.8: Σχηματική αναπαράσταση φασματομέτρου μαζών με τρία τετράπολα [46].

Από τα τετράπολα αυτά, μόνο το πρώτο και το τρίτο τετράπολο είναι αναλυτές μάζας, τα οποία λειτουργούν με συνδυασμό και των δύο δυναμικών, ραδιοσυχνότητας (radio frequency: r.f.) και σταθερού δυναμικού (direct current: d.c.), έτσι ώστε να επιτρέπουν τη διέοδο μόνο των επιθυμητών ιόντων με κατάλληλη επιλογή του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z). Η λειτουργία αυτών των τετραπόλων παριστάνεται στο Σχήμα 2.9.



Σχήμα 2.9: Σχηματική αναπαράσταση τετραπόλου [47].

Στο δεύτερο τετράπολο, εφαρμόζεται μόνο ένα σταθερό δυναμικό r.f.. Στην περίπτωση αυτή, ιόντα οποιουδήποτε λόγου m/z μπορούν να περάσουν αυτό το τετράπολο, το οποίο λειτουργεί ως κυψελίδα πρόσκρουσης με ιδιότητες εστίασης ιόντων. Ο εστιασμός των ιόντων στην κυψελίδα πρόσκρουσης οφείλεται στην επίδραση του δυναμικού r.f. Τα ιόντα υφίστανται προσκρούσεις με ένα ευγενές αέριο που διοχετεύεται μέσα στην κυψελίδα, η μεταβολή πολικότητας όμως του εφαρμοζόμενου δυναμικού r.f. τα αναγκάζει να επανέλθουν πίσω στο κέντρο της διάταξης ούτως ώστε να μην δημιουργούνται προβλήματα απώλειας των διασκορπισμένων ιόντων. Τα εξερχόμενα ιόντα από το τετράπολο-κυψελίδα q2, διέρχονται από το τρίτο τετράπολο Q3, το οποίο επιτρέπει τη διόδο μόνο των επιθυμητών ιόντων με κατάλληλη επιλογή του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z). Βασικό πλεονέκτημα των αναλυτών μάζας με τρία τετράπολα, είναι οι υψηλές ταχύτητες σάρωσης.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε σε αυτή την εργασία για τον προσδιορισμό της παρουσίας των τριαζολών σε υδατικά απόβλητα καθώς και σε κάποια εμπορικά προϊόντα που πιθανόν να περιέχουν τις ενώσεις αυτές, στηρίζεται στην παρακολούθηση 11 μεταβάσεων μάζας (MS-MS transitions) στη διάρκεια της βαθμιδωτής έκλουσης του δείγματος. Η τεχνική της παρακολούθησης μιας χαρακτηριστικής αντίδρασης (SRM), η οποία εφαρμόστηκε στην εργασία αυτή αναπτύσσεται αναλυτικά στην ενότητα 3.3. Το φασματόμετρο μάζας προγραμματίζεται στην αρχή για πόσες και ποιες μεταβάσεις μάζας θα παρακολουθηθούν. Η προτεινόμενη μέθοδος περιλαμβάνει 11 γεγονότα σάρωσης (scan events). Κάθε scan event προγραμματίζεται ξεχωριστά για τις παραμέτρους λειτουργίας του.

Ως αέριο πρόσκρουσης (collision gas) χρησιμοποιήθηκε αργό υπερυψηλής καθαρότητας (99,999%) που περιέχεται σε μεταλλική ανοξείδωτη φιάλη. Στην κυψελίδα πρόσκρουσης, η πίεση του αερίου αργού έχει ρυθμιστεί στο 1 mTorr. Οι βέλτιστες τιμές ενέργειας διάσπασης στην πηγή (Source CID) και δυναμικού κυλινδρικού φακού (Tube Lens Offset) προσδιορίστηκαν χωριστά για κάθε αναλυόμενη ένωση, και αναγράφονται

στον Πίνακα 3.7. Η βελτιστοποίηση των συνθηκών επιτυγχάνεται για κάθε ένωση χωριστά με απ' ευθείας , συνεχή τροφοδοσία (έγχυση) (direct infusion) των αναλυόμενων ουσιών από μια σύριγγα που συμπιέζεται με αντλία (syringe pump). Η σύριγγα αυτή είναι ηλεκτρονικά ελεγχόμενη και το διάλυμα απελευθερώνεται από τη σύριγγα μέσα στην πηγή ηλεκτροψεκασμού.

2.2. Δειγματοληψίες

Ως δειγματοληψία ορίζεται η διαδικασία επιλογής, συλλογής, διατήρησης και μεταφοράς προς ανάλυση, μιας συγκεκριμένης ποσότητας ενός υλικού. Η ποσότητα αυτή (δείγμα) πρέπει να ανταποκρίνεται στα χαρακτηριστικά του προς ανάλυση υλικού και να επιτρέπει την αναγωγή των παραμέτρων που θα προσδιορισθούν στο δείγμα. Όσον αφορά την ανάλυση των δειγμάτων, η σειρά των ενεργειών περιελάμβανε τις διαδικασίες ανάκτησης των συστατικών που έπρεπε να αναλυθούν, την επιλογή των πιο κατάλληλων συνθηκών - μεθόδων για τον διαχωρισμό, τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό αυτών.

Πέραν λοιπόν, της ανάπτυξης και της βελτιστοποίησης της αναλυτικής μεθοδολογίας, στην παρούσα εργασία έγινε κι εφαρμογή αυτής για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των τριαζολών σε πραγματικά δείγματα. Στα πραγματικά αυτά δείγματα συγκαταλέγονται και δείγματα τα οποία ελήφθησαν από τον Σταθμό Βιολογικής Επεξεργασίας Λυμάτων (Σ.Β.Ε.Λ.).

Ο τρόπος με τον οποίο έγινε η δειγματοληψία, αφορούσε συγκεκριμένα στάδια της βιολογικής επεξεργασίας κι έγινε λήψη συγκεκριμένου όγκου και ποσότητας δειγμάτων. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην μεταχείριση των δειγμάτων μετά την λήξη της δειγματοληψίας καθώς αυτά πρέπει να συντηρηθούν σε χαμηλή θερμοκρασία έως ότου αρχίσει η επεξεργασία τους, προκειμένου να αποφευχθεί η δράση του ήδη υπάρχοντος μικροβιακού φορτίου. Η επεξεργασία των δειγμάτων κρίνεται αναγκαίο να πραγματοποιηθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα από την λήψη τους. Πιο συγκεκριμένα τα στοιχεία που αφορούν στις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν αναγράφονται συνοπτικά στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1: Δειγματοληψίες

	Ημερομηνία Δειγματοληψίας	Στάδιο Επεξεργασίας	Ωρα	Θερμοκρασία °C	Ποσότητα
1η Δειγματοληψία	29/3/2005	Αντλιοστάσιο Εισόδου	10.50	22,0	60 ml
			12.20	23,0	60 ml
			13.50	23,5	60 ml
	29/3/2005	Δίαυλος Parshall	11.00	22,5	60 ml
			12.30	24,0	60 ml
			14.00	24,5	60 ml
	29/3/2005	Έξοδος Α' ΔΚ	11:05	23,0	60 ml
			12:35	23,0	60 ml
			14:05	23,0	60 ml
	29/3/2005	Είσοδος Β' ΔΚ (πριν την χλωρίωση)	11.10	23,0	60 ml
			12.40	23,0	60 ml
			14.10	23,5	60 ml
29/3/2005	Έξοδος Β' ΔΚ (μετά την χλωρίωση)	11.20	21,5	60 ml	
		12.50	23,0	60 ml	
		14.20	23,5	60 ml	
29/3/2005	Αντλιοστάσιο Α' Λάσπης	12.00	21,0	300 g	
29/3/2005	Αντλιοστάσιο Β' Λάσπης	12.10	28,0	300 g	
29/3/2005	Αφυδατωμένη Λάσπη	12.15	26,0	300 g	
2η Δειγματοληψία	4/11/2005	Αντλιοστάσιο Εισόδου "ΕΙΣΟΔΟΣ"	10.00	22,0	1,5 lt
	4/11/2005	Δίαυλος Parshall	10.10	24,0	1,5 lt
	4/11/2005	Είσοδος Β' ΔΚ (πριν την χλωρίωση) "ΕΞΟΔΟΣ"	10.30	22,5	1,5 lt
3η Δειγματοληψία	7/12/2005	Αντλιοστάσιο Εισόδου "ΕΙΣΟΔΟΣ"	09.05	22,0	1,5 lt
	7/12/2005	Δίαυλος Parshall	09.15	24,0	1,5 lt
	7/12/2005	Είσοδος Β' ΔΚ (πριν την χλωρίωση) "ΕΞΟΔΟΣ"	10.00	22,5	1,5 lt

Το Αντλιοστάσιο της Εισόδου αντιστοιχεί στην είσοδο των αποβλήτων στον χώρο του βιολογικού, σ' αυτό το στάδιο τα λύματα δεν έχουν υποστεί καμία επεξεργασία. Το αμέσως επόμενο στάδιο της δειγματοληψίας είναι από τον *δίαυλο Parshall* όπου και πραγματοποιείται εξισορρόπηση της παροχής των λυμάτων. Ακολουθεί η μηχανική επεξεργασία των λυμάτων και εν συνεχεία, τα λύματα οδηγούνται στην *Α' δεξαμενή καθίζησης*. Το στάδιο αυτό ανήκει στην δευτεροβάθμια επεξεργασία λυμάτων, όπου και λαμβάνει χώρα η βιολογική αποδόμηση των λυμάτων με μικροοργανισμούς. Το τελευταίο στάδιο δειγματοληψίας αντιστοιχεί στην *Β' δεξαμενή καθίζησης*. Στην *Β' δεξαμενή καθίζησης* τα λύματα υφίστανται απολύμανση με χλώριο.

Όλες οι δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν στο στάδιο *πριν την χλωρίωση*, ενώ στην πρώτη δειγματοληψία έγινε και λήψη δείγματος *μετά την χλωρίωση*. Το στάδιο *Εισόδου Β' ΔΚ* για την 2^η και 3^η δειγματοληψία αναφέρεται ως *έξοδος* (κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων), καθώς αποτελεί το στάδιο εκροής των υγρών αποβλήτων.

2.3. Αντιδραστήρια, δείγματα κι επεξεργασία δειγμάτων

2.3.1. Αντιδραστήρια

1. Βενζοτρίαζόλη (Riedel de Haen - 99%)
2. Τολουτρίαζόλη (Dr. Ehrestorfer GmbH - 99,5%)
3. 5,6-διμέθυλο-βενζοτρίαζόλη (Aldrich - 99%)
4. Οξικό οξύ (Merck - 100%)
5. Μεθανόλη (Riedel de Haen - 99%)
6. Απιονισμένο νερό (nanopure)

2.3.2. Δείγματα

Πέραν των δειγμάτων τα οποία ελήφθησαν από τον Σταθμό Βιολογικής Επεξεργασίας Λυμάτων (Σ.Β.Ε.Λ.), μελετήθηκαν και κάποια εμπορικά προϊόντα. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε ένα δείγμα αντιπηκτικού υγρού αυτοκινήτου, ένα απορρυπαντικό πλυντηρίου πιάτων και ένα υγρό απορρυπαντικό πλυντηρίου ρούχων. Τα δείγματα αυτά ήταν «ύποπτα» για την παρουσία των τριαζολών σε αυτά, εξ' αιτίας του ότι υπήρχε επαφή μεταλλικών επιφανειών με υδάτινο περιβάλλον. Συνεπώς θα ήταν επιτακτική η ανάγκη παρουσίας κάποιων ενώσεων οι οποίες θα προστάτευαν τις μεταλλικές αυτές επιφάνειες από διάβρωση.

Οι ποσότητες καθώς και το αν αποδείχθηκε η παρουσία των ενώσεων αυτών στα παραπάνω δείγματα, αναφέρονται εκτενώς στο Κεφ. 3.4.

2.3.3. Επεξεργασία δειγμάτων σταθμού βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων

Η διαδικασία η οποία ακολουθείται για την επεξεργασία των δειγμάτων, παριστάνεται σχηματικά στο Σχήμα 2.10. Η διαδικασία αυτή αναλύεται, ξεχωριστά για την υγρή και την σωματιδιακή φάση, ακολούθως.

D) Υγρή φάση

Η διαδικασία η οποία ακολουθείται, προκειμένου ένα υγρό δείγμα βιολογικού να φτάσει σε κατάλληλη μορφή, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τον ποιοτικό όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων που μας ενδιαφέρουν είναι η ακόλουθη:

1) Διήθηση δείγματος

Το φιλτράρισμα του δείγματος γίνεται εις διπλούν με την χρήση φίλτρων διαφορετικής διαμέτρου των πόρων:

α. Glass Fiber Filters: 47mm – 3,00μm, Pall Corporation Life Sciences

β. Hydrophilic Polypropylene Membrane Filters: 47mm – 0,45μm, Pall Corporation Life Science.

Με τον τρόπο αυτό απομακρύνεται η σωματιδιακή φάση, η μάζα της οποίας υπολογίζεται ακολούθως από την διαφορά μάζας, πριν και μετά το φιλτράρισμα.

2) Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE: Solid Phase Extraction)

α. Χρήση των Waters OASIS 3cc (60mg) Extraction Cartridges

β. Ενεργοποίηση των φουσιγγίων (cartridges) με διαδοχική χρήση των ακόλουθων διαλυτών:

- 10 ml διχλωρομεθάνιο (3% μεθανόλη)

- 10 ml μεθανόλη

- 10 ml απιονισμένο νερό

γ. Διαβίβαση των υγρών δειγμάτων στα φουσιγγια. Προκειμένου να επιτευχθούν μεγαλύτερες ταχύτητες ροής εφαρμόζεται κενό. Προσοχή πρέπει

να δοθεί στην ταχύτητα ροής η οποία δεν πρέπει να ξεπεράσει τα 4,5 ml/min. Αυτό συμβαίνει γιατί σε μεγαλύτερες ταχύτητες ο χρόνος επαφής του δείγματος με το προσροφητικό υλικό δεν είναι αρκετός ώστε να συγκρατηθούν οι ενώσεις που μας ενδιαφέρουν.

Αξίζει να σημειωθεί ότι μέχρι την έκλυση των ενώσεων από τα φύσιγγα, αυτά μπορούν να φυλαχθούν στην συντήρηση.

3) Έκλυση των ενώσεων

Η έκλυση γίνεται με χρήση: 4 ml διχλωρομεθανίου

4) Συμπύκνωση των εκλουσμάτων

Τα εκλούσματα εξατμίζονται μέχρι ξηρού, με διαβίβαση ρεύματος αερίου N₂. Προσθήκη 3 ml μίγματος: μεθανόλης/νερού=1/1.

5) Διήθηση Εκλούσματος

Το τελευταίο αυτό φιλτράρισμα πραγματοποιείται προκειμένου να εξασφαλιστεί η απουσία σωματιδίων τα οποία θα μπορούσαν να προκαλέσουν μπλοκάρισμα στην βελόνα του αυτόματου δειγματολήπτη (autosampler) ή και στην ίδια την στήλη κατά των διαχωρισμό. Το φιλτράρισμα αυτό πραγματοποιείται με εισαγωγή του δείγματος σε σύριγγα και εξαγωγή αυτού μέσω κατάλληλου φίλτρου το οποίο έχει εφαρμοστεί στην έξοδο της σύριγγας. Στην προκειμένη περίπτωση τα φίλτρα που χρησιμοποιούνται είναι: Gelman: 0,45μm (PALL GHP ACRODISC 13).

II) Σωματιδιακή φάση

Η διαδικασία η οποία ακολουθείται, προκειμένου ένα υγρό δείγμα βιολογικού να φτάσει σε κατάλληλη μορφή, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τον ποιοτικό όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων που μας ενδιαφέρουν είναι η ακόλουθη:

1) Υπολογισμός μάζας δείγματος

Αν πρόκειται για την σωματιδιακή φάση η οποία απομονώθηκε από τα υγρά απόβλητα, ο υπολογισμός της μάζας τους γίνεται έμμεσα από την διαφορά της μάζας των φίλτρων πριν και μετά την διήθηση, αφού πρώτα ξηραθούν σε κενό.

2) Συνεχής Εκχύλιση (Soxhlet)

Τα φίλτρα τοποθετούνται σε φυσιγγία (thimples) και αυτά με την σειρά τους σε συσκευές soxhlet. Η εκχύλιση γίνεται με χρήση μεθανόλης και η διάρκεια της εκχύλισης είναι 24 ώρες. Η θερμοκρασία ρυθμίζεται έτσι ώστε ο διαλύτης να ανανεώνεται 2 φορές την ώρα μέσα στον χώρο που βρίσκεται το δείγμα.

3) Εξάτμιση των εκχυλισμάτων

Λαμβάνονται τα εκχυλίσματα και εξατμίζονται με την βοήθεια του ρότορα, σχεδόν μέχρι ξηρού. Στην συνέχεια προστίθεται 250 ml απιονισμένου νερού στην σφαιρική η οποία περιείχε το εκχύλισμα, και το διάλυμα αυτό φιλτράρεται με τον τρόπο που αναφέρεται ακολούθως, ώστε να αποφευχθεί η τυχόν παρουσία στερεών η οποία μπορεί να οδηγήσει στο μπλοκάρισμα κατά την εκχύλιση στερεάς φάσης.

4) Διήθηση δείγματος

Η διήθηση του δείγματος γίνεται εις διπλούν με την χρήση φίλτρων διαφορετικής διαμέτρου των πόρων:

α. Glass Fiber Filters: 47mm - 3,00μm, Pall Corporation Life Sciences

β. Hydrophilic Polypropylene Membrane Filters: 47mm - 0,45μm, Pall Corporation Life Science.

Σκοπός αυτού του φιλτραρίσματος είναι η απομάκρυνση τυχόν σωματιδίων, τα οποία μπορεί να έχουν περάσει από την σωματιδιακή φάση στην μεθανόλη κατά την υπερχειλίση του διαλύτη από την soxhlet. Το στάδιο αυτό δρα βοηθητικά για το ακόλουθο βήμα, γιατί επιτρέπει την αποφυγή του μπλοκαρίσματος των φυσιγγίων (cartridges).

5) Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid Phase Extraction: SPE)

α. Χρήση των Waters OASIS 3cc (60mg) Extraction Cartridges.

β. Ενεργοποίηση των φουσιγγίων με διαδοχική χρήση των ακόλουθων διαλυτών:

- 10 ml διχλωρομεθάνιο (3% μεθανόλη)

- 10 ml μεθανόλη

- 10 ml απιονισμένο νερό

γ. Διαβίβαση των υγρών δειγμάτων στα φουσιγγια (cartridges). Προκειμένου να επιτευχθούν μεγαλύτερες ταχύτητες ροής, εφαρμόζεται κενό, χωρίς όμως η ταχύτητα να ξεπεράσει τα 4,5 ml/min.

6) Έκλουση των ενώσεων

Η έκλουση γίνεται με χρήση: 4 ml διχλωρομεθανίου

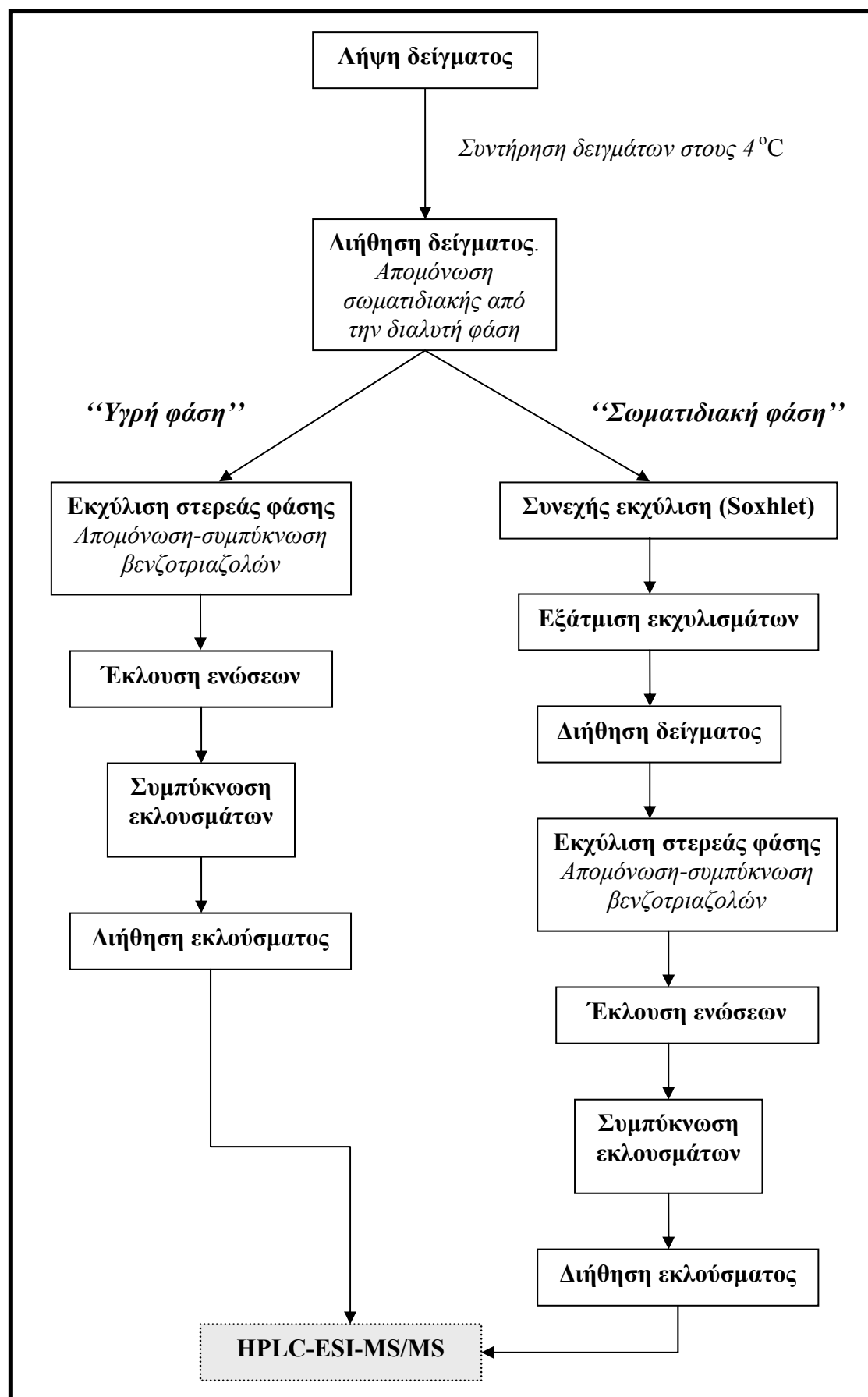
7) Συμπύκνωση των εκλουσμάτων

Τα εκλούσματα εξατμίζονται μέχρι ξηρού, με διαβίβαση ρεύματος αερίου N₂. Προσθήκη 1 ml μίγματος: Methanol/Water=1/1.²

8) Διήθηση Εκλούσματος

Το τελευταίο αυτό φιλτράρισμα πραγματοποιείται προκειμένου να εξασφαλιστεί η απουσία σωματιδίων τα οποία θα μπορούσαν να προκαλέσουν μπλοκάρισμα στην βελόνα του αυτόματου δειγματολήπτη (autosampler) ή και στην ίδια την στήλη κατά των διαχωρισμό. Το φιλτράρισμα αυτό πραγματοποιείται με εισαγωγή του δείγματος σε σύριγγα και εξαγωγή αυτού μέσω κατάλληλου φίλτρου το οποίο έχει εφαρμοστεί στην έξοδο της σύριγγας. Στην προκειμένη περίπτωση τα φίλτρα που χρησιμοποιούνται είναι: Gelman: 0,45μm (PALL GHP ACRODISC 13).

² Στην περίπτωση των εκλουσμάτων τα οποία προέρχονται από στερεά προστίθεται 1 αντί 3 ml (μεθανόλης/νερού=1/1), γιατί η παρουσία των τριαζολών σε αυτά αναμένεται να είναι μικρότερη. Αυτό οφείλεται στην μεγάλη υδροφιλικότητα και διαλυτότητα των ενώσεων αυτών στο νερό.



Σχήμα 2.10: Αναλυτική διαδικασία επεξεργασίας διαλυτής και σωματιδιακής φάσης.

2.3.4. Επεξεργασία εμπορικών δειγμάτων

I) Απορρυπαντικό πλυντηρίου πιάτων

Η προετοιμασία και η επεξεργασία του δείγματος του απορρυπαντικού πλυντηρίου πιάτων (Calgonit) γίνεται ως εξής:

- α. Διάλυση 1 g απορρυπαντικού σε 250 ml νερού.
- β. Το υδατικό διάλυμα που προκύπτει επεξεργάζεται όπως και τα υγρά δείγματα του βιολογικού σταθμού (Τμήμα 2.3.3: I).

Το συγκεκριμένο δείγμα επιλέγεται για μελέτη εξ' αιτίας της επαφής του νερού με τα μεταλλικά μέρη των πλυντηρίων πιάτων στα οποία είναι απαραίτητη η παρουσία κάποιας ένωσης η οποία θα παρείχε προστασία έναντι της οξείδωσης. Πολύ πιθανή λοιπόν θα ήταν η παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων σε δείγμα απορρυπαντικού πλυντηρίων πιάτων. Άλλος ένας λόγος που μας οδήγησε στην επιλογή και τελικά στην μελέτη αυτού του προϊόντος είναι η βιβλιογραφία η οποία αναφέρει την παρουσία των τριαζολών σε απορρυπαντικά πλυντηρίων πιάτων.

II) Απορρυπαντικό πλυντηρίου ρούχων

Η προετοιμασία και η επεξεργασία του δείγματος του απορρυπαντικού πλυντηρίου ρούχων (Skip) γίνεται ως εξής:

- α. Διάλυση 1 ml απορρυπαντικού σε 250 ml νερού.
- β. Το υδατικό διάλυμα που προκύπτει επεξεργάζεται όπως και ένα υγρό δείγμα του βιολογικού (Τμήμα 2.3.3: I).

Το συγκεκριμένο δείγμα επιλέγεται για μελέτη για τους ίδιους λόγους που επιλέχθηκε και το Calgonit.

III) Αντιψοκτικό

Η προετοιμασία και η επεξεργασία του δείγματος του αντιψοκτικού αυτοκινήτων γίνεται ως εξής:

- α. Διάλυση 1 ml απορρυπαντικού σε 250 ml νερού.

β. Το υδατικό διάλυμα που προκύπτει επεξεργάζεται όπως και ένα υγρό δείγμα του βιολογικού (Τμήμα 2.2.3: Ι).

Το συγκεκριμένο δείγμα επιλέγεται για μελέτη για τους ίδιους λόγους που επιλέχθηκε και τα προηγούμενα δείγματα (προστασία μεταλλικών επιφανειών από οξείδωση) αλλά κι εξ' αιτίας της ευρείας χρήσης των τριαζολών σε αντιψυκτικά προϊόντα, όπως αναφέρεται στο θεωρητικό τμήμα της εργασίας.

3. Αποτελέσματα - Ανάλυση αποτελεσμάτων

3.1. Διεργασίες Ανάπτυξης και Βελτιστοποίησης της Αναλυτικής Μεθόδου

3.1.1. Μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας με χρήση ανιχνευτή DAD³

Μία αναλυτική στήλη για να κριθεί κατάλληλη για την μελέτη της παρουσίας των ενώσεων που μας ενδιαφέρουν πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- α) να διαχωρίζει ικανοποιητικά όλες τις υπό μελέτη ενώσεις.
- β) να παρέχει λεπτές και συμμετρικές κορυφές για όλες τις υπό εξέταση ουσίες. Αυτό εκτιμάται με τη χρωματογραφική απόδοση (efficiency, N) της στήλης, όπως αυτή εκφράζεται με τον αριθμό των θεωρητικών της πλακών και το συντελεστή ασυμμετρίας (asymmetry factor).
- γ) να είναι εκλεκτική μεταξύ ουσιών που εμφανίζονται συχνά στα προς ανάλυση δείγματα.

Θα πρέπει βέβαια να σημειωθεί ότι και η κινητή φάση η οποία χρησιμοποιείται συμβάλλει σημαντικά στην επίτευξη του διαχωρισμού των υπό μελέτη ενώσεων.

Η ανάλυση των συστατικών του δείγματος γίνεται με υγρή χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως (reversed phase) σε αναλυτική στήλη C-18. Η στήλη που επιλέχθηκε για το σύστημά μας είναι η MZ-PAH, C-18, με διαστάσεις 250x4,0 mm και διάμετρο σωματιδίων 5 μm. Το μήκος της στήλης επιλέχθηκε στα 25 cm σαν ένας συμβιβασμός μεταξύ του χρόνου ανάλυσης και της ποιότητας του διαχωρισμού. Όσο αυξάνεται το μήκος της αναλυτικής στήλης αυξάνεται η ποιότητα του διαχωρισμού, συγχρόνως όμως αυξάνει και ο απαιτούμενος χρόνος ανάλυσης.

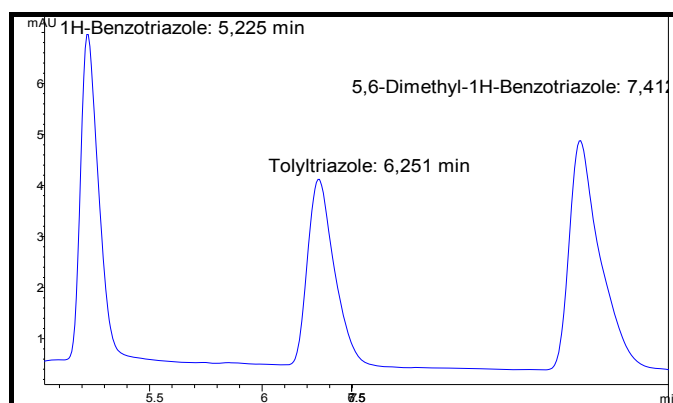
³ Η βελτιστοποίηση των συνθηκών χρωματογραφικής ανάλυσης έγινε στο σύστημα υγρής χρωματογραφίας HPLC-UV, πριν να οδηγηθούν στο σύστημα ανάλυσης HPLC-ES-MS/MS.

Η έκλυση των ενώσεων που μας αφορούν γίνεται με χρήση προγράμματος βαθμιδωτής έκλυσης, και χρήση των διαλυτών: μεθανόλη και απιονισμένο νερό (0,2% οξικό οξύ). Η ταχύτητα ροής έχει επιλεγεί στα 0,800 ml/min, ενώ η ανάμειξη των διαλυτών όπως αυτή καθορίζεται από το πρόγραμμα της βαθμιδωτής έκλυσης συναρτήσει του χρόνου παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.1:

Πίνακας 3.1: Παράμετροι λειτουργίας του προγράμματος βαθμιδωτής έκλυσης

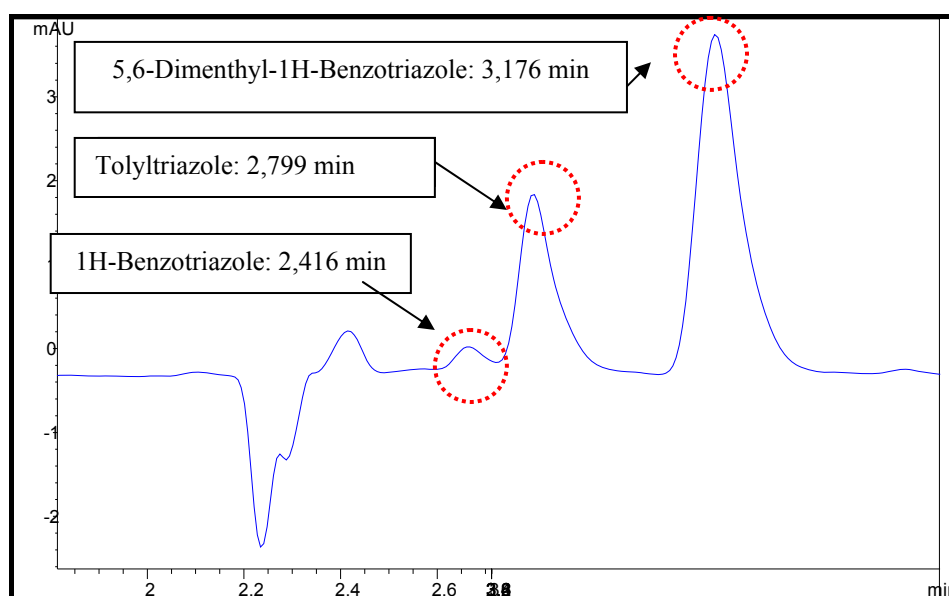
Χρόνος (min)	% Μεθανόλη	Ταχύτητα ροής (ml/min)
0,00	20	0,800
2,00	50	0,800
9,00	50	0,800
12,00	80	0,800
15,00	20	0,800

Η διάρκεια του προγράμματος βαθμιδωτής έκλυσης επιλέχθηκε στα 15.00 min, σαν ένας συμβιβασμός μεταξύ του χρόνου ανάλυσης, της ποιότητας του διαχωρισμού και της ευαισθησίας του συστήματος, στο βαθμό που αυτή εξαρτάται από το πλάτος των κορυφών. Μεγαλύτερα χρονικά προγράμματα χρωματογραφικής ανάλυσης επιφέρουν καλύτερη ποιότητα διαχωρισμού, αλλά στις περιπτώσεις αυτές εκτός του ότι αυξάνεται ο χρόνος ανάλυσης, αυξάνεται και το πλάτος των κορυφών με αποτέλεσμα να μειώνεται η ευαισθησία της μεθόδου. Με χρήση αυτού του προγράμματος έκλυσης για ένα μίγμα των τριών ενώσεων, λαμβάνεται το Χρωματογράφημα 3.1:



Χρωματογράφημα 3.1: Βαθμιδωτή έκλυση(πρόγραμμα έκλυσης-Πίνακ. 3.1)

Αξιζει να σημειωθεί ότι το παραπάνω πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης είναι αποτέλεσμα βελτίωσης του καλύτερου δυνατού διαχωρισμού. Καταλήξαμε σ' αυτό αφού πρώτα πραγματοποιήθηκαν πειράματα ισοκρατικής έκλουσης, πειράματα με ή χωρίς οξικό οξύ στην υδατική φάση, αλλά και πειράματα προγραμμάτων έκλουσης μεγαλύτερης διάρκειας. Ενδεικτικά παρουσιάζεται ένα χρωματογράφημα, ενός μείγματος των τριών ενώσεων (130 ppb), με ισοκρατική έκλουση (60% μεθανόλη, 40% απιονισμένο νερό - 0,2% οξικό οξύ). Στο Χρωματογράφημα 3.2 αυτό δεν παρατηρείται καλός διαχωρισμός της ΒΖΤ και της ΤΤΑ.



Χρωματογράφημα 3.2: Ισοκρατική έκλουση (60% μεθανόλη, 40% απιονισμένο νερό +0,2% οξικό οξύ)

Η λήψη του δείγματος πραγματοποιείται από αυτόματο δειγματολήπτη (auto sampler). Για την λειτουργία αυτού έχει αναπτυχθεί πρόγραμμα που καθορίζει όλες τις παραμέτρους λειτουργίας του. Οι παράμετροι αυτές αναγράφονται στον Πίνακα 3.2:

Πίνακας 3.2: Παράμετροι λειτουργίας του αυτόματου δειγματολήπτη (autosampler).

<u>Παράμετρος/Μονάδες</u>	<u>Τιμή</u>
Εισαγόμενος όγκος δείγματος (μl)	20,000
Απόσταση βελόνας από τον πυθμένα του vial (mm)	2,000
Ταχύτητα εισαγωγής του δείγματος (μl/s)	8,000
Ταχύτητα έκπλυσης (μl/s)	250,000
Μοντέλο εισαγωγής δείγματος	Full loop
Ταχύτητα τροφοδοσίας του δείγματος (μl/s)	8,000
Θερμοκρασία στήλης (°C)	45,0

Πέραν του προγράμματος λειτουργίας του αυτόματου δειγματολήπτη, έχει αναπτυχθεί και πρόγραμμα για το ξέπλυμα της σύριγγας του αυτόματου δειγματολήπτη, και αυτό ακολουθεί την διαδικασία που περιγράφεται συνοπτικά στον Πίνακα 3.3:

Πίνακας 3.3: Πρόγραμμα ξέπλυματος της σύριγγας του αυτόματου δειγματολήπτη

<p>1. Έκπλυση σύριγγας Όγκος διαλύτη έκπλυσης: 400,0 μl Φιαλίδιο 2: Μεθανόλη</p>
<p>2. Έκπλυση σύριγγας Όγκος διαλύτη έκπλυσης: 400,0 μl Φιαλίδιο: Μπουκάλι με διαλύτη έκπλυσης (Μεθανόλη/ Απιονισμένο νερό=1/1)</p>
<p>3. Έκπλυση σύριγγας Όγκος διαλύτη έκπλυσης: 400,0 μl Φιαλίδιο: Μπουκάλι με διαλύτη έκπλυσης (Μεθανόλη/ Απιονισμένο νερό=1/1)</p>

Το ξέπλυμα της σύριγγας κρίνεται απαραίτητο για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων, κι αυτό γιατί η ακρίβεια εισαγωγής του δείγματος

εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την καθαρότητα της σύριγγας. Μιας και η παραμονή υπολειμμάτων σε αυτήν μπορεί να δημιουργήσει πρόβλημα σε επόμενες εγχύσεις δείγματος. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται διαλύτες κατάλληλης πολικότητας, οι οποίοι είναι τοποθετημένοι σε ειδικά γυάλινα φιαλίδια, τα οποία βρίσκονται εντός του αυτόματου δειγματολήπτη, αλλά και σε γυάλινο μπουκάλι (διαλύτης έκπλυσης μεθανόλη/απιονισμένο νερό=1/1), χωρητικότητας 1l το οποίο είναι τοποθετημένο στον χώρο που βρίσκονται οι διαλύτες της κινητής φάσης.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι πριν από κάθε έναρξη της διαδικασίας μετρήσεων και πριν από την εισαγωγή δείγματος, λαμβάνεται πρόνοια για την απομάκρυνση φυσαλίδων αέρα από τους διαλύτες με την βοήθεια των αντλιών. Αυτό επιτυγχάνεται με απαέρωση των χρησιμοποιούμενων διαλυτών, και εκδίωξη 20 ml περίπου από αυτούς στα απόβλητα. Κατά την διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται υψηλή ροή (2ml/min) ενώ η χρωματογραφική στήλη έχει αποσυνδεθεί.

3.1.2. Ηλεκτροψεκασμός

Οι παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την ανάπτυξη μίας ευαίσθητης κι εκλεκτικής μεθόδου φασματομετρίας μάζας-ηλεκτροψεκασμού ποικίλουν. Οι βασικότερες από αυτές τις παραμέτρους είναι οι εξής:

- η σύσταση της κινητής φάσης, έτσι κατάλληλοι θεωρούνται οι διαλύτες οι οποίοι έχουν σχετικά χαμηλή επιφανειακή τάση ώστε να επιτυγχάνεται σταθερός ηλεκτροψεκασμός

- οι χημικές ιδιότητες του αναλύτη:

- Όσο περισσότερο υδρόφοβο χαρακτήρα έχει ο αναλύτης τόσο πιο εύκολα έρχεται στην επιφάνεια της σταγόνας κατά τον ηλεκτροψεκασμό. Αυτό συμβαίνει γιατί λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα του η συγγένεια του με την υδατική φάση είναι μειωμένη και συνεπώς ευνοείται η απομάκρυνση του από την φάση αυτή.

▪ Κατάλληλοι θεωρούνται οι αναλύτες οι οποίοι βρίσκονται υπό την μορφή ιόντων στην υγρή φάση. Αυτό συμβάλλει σημαντικά στην αποδοτικότητα του ηλεκτροψεκασμού. Συνεπώς, η παρουσία ομάδων στον αναλύτη οι οποίες μπορούν να ιονισθούν επηρεάζει θετικά την απόκριση του συστήματος του ηλεκτροψεκασμού.

- το δυναμικό ηλεκτροψεκασμού, το οποίο επηρεάζει την μεταφορά ιόντων του αναλύτη από την υγρή φάση

- το δυναμικό το οποίο εφαρμόζεται στους φακούς εστίασης για την βέλτιστη μεταφορά ιόντων από την πηγή ιοντισμού προς τον αναλυτή μάζας

- η επιλογή κατάλληλης μεθόδου σάρωσης στον αναλυτή μάζας

3.1.3. Τεχνική Σάρωσης με Μελέτη Χαρακτηριστικών Αντιδράσεων

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε σε αυτή την εργασία, εφαρμόζει την τεχνική (SRM: Selected Reaction Monitoring) κατά την οποία παρακολουθείται μια χαρακτηριστική αντίδραση ή μια ομάδα αντιδράσεων για κάθε αναλυόμενη ένωση, αντιδράσεις όπως είναι η θραυσματοποίηση ενός ιόντος. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει σήμερα τεράστιο ενδιαφέρον και ευρύτητα εφαρμογών λόγω της απλότητας, της συντομίας και της υψηλής ακρίβειας που προσφέρει. Η τεχνική αυτή επιτυγχάνεται συνήθως με τον κατάλληλο καθορισμό του πρόδρομου ιόντος (με βάση το λόγο της μάζας προς το φορτίο, m/z) και την παρακολούθηση θυγατρικών ιόντων.

Για το σκοπό αυτό καθορίζεται ένα πρόδρομο ιόν και ένα ή περισσότερα θυγατρικά για κάθε υπό μελέτη ένωση (κατάλληλα διαλεγμένα με βάση τα δεδομένα των καμπυλών θραυσματοποίησης). Η δυνατότητα επιλογής περισσότερων από ένα ιόντων σε κάθε ένωση που μελετάται, καθιστά τη μέθοδο αυτή ιδιαίτερα αποτελεσματική στην ανάλυση λόγω της εξαιρετικά μεγάλης ακρίβειάς της, σε αντίθεση με τη μέθοδο SIM (Selected Ion Monitoring) η οποία υστερεί σε εκλεκτικότητα και συνεπώς σε ακρίβεια.

Η μέθοδος SIM είναι μια εναλλακτική μέθοδος σάρωσης, γενικά εφαρμόσιμη, κατά την οποία ένα χαρακτηριστικό ιόν ή μια ομάδα ιόντων

παρακολουθείται σε μια ένωση. Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου αυτής αποτελεί το γεγονός ότι τα ιόντα μιας ένωσης που έχουν επιλεγεί να παρατηρούνται πιθανόν να σχηματίζονται και από ορισμένες άλλες ενώσεις που συνυπάρχουν στο δείγμα. Τα μόρια των συνυπαρχουσών αυτών ενώσεων ιονίζονται και διασπώνται προς διάφορα θραύσματα, μερικά από τα οποία πιθανόν να έχουν τις συγκεκριμένες σχέσεις μάζας προς φορτίο που έχουν καθορισθεί για τη μελέτη της αναλυόμενης ένωσης. Ως εκ τούτου, η τεχνική αυτή δεν είναι πολύ ακριβής ενώ προκύπτουν θετικά σφάλματα κατά την εφαρμογή της, διότι παράγεται και τελικά προσδιορίζεται ποσότητα ιόντων (ένταση σήματος) μεγαλύτερη από αυτήν που αντιστοιχεί στην προσδιοριζόμενη ουσία.

Με τη χρήση όμως της μεθόδου SRM είναι δυνατόν να αποφύγουμε τέτοια σφάλματα. Κι αυτό γιατί σ' αυτή την τεχνική, οι παρεμποδίζουσες ενώσεις που περιέχονται στο δείγμα θα πρέπει αρχικά να παράγουν πρόδρομο ιόν, του οποίου η τιμή m/z να είναι ταυτόσημη με αυτήν του πρόδρομου ιόντος που έχει καθορισθεί για την αναλυόμενη ένωση, και επιπλέον το πρόδρομο αυτό ιόν θα πρέπει να διασπασθεί προς ορισμένα θραύσματα, ένα από τα οποία θα πρέπει να έχει τον ίδιο λόγο m/z με αυτόν του θυγατρικού ιόντος που έχει καθορισθεί για την αναλυόμενη ένωση. Αυτή η αυστηρότητα των συνθηκών που απαιτούνται, καθιστά την τεχνική αυτή ένα πολύτιμο μέσο για την ανάλυση και η σπουδαιότητά της συνεχώς μεγαλώνει και συμβαδίζει με την πρόοδο της τεχνολογίας των χρησιμοποιούμενων συσκευών και της μεθοδολογίας.

3.1.4. Διαδικασία επιλογής θυγατρικών ιόντων για την παρακολούθηση τους με την μέθοδο SRM (Selected Reaction Monitoring)

Προκειμένου να εφαρμοστεί η μέθοδος επιλεγμένων αντιδράσεων SRM απαιτείται η μελέτη των αντιδράσεων διάσπασης των ενώσεων που μελετάμε στην κυψελίδα πρόσκρουσης του φασματομέτρου μάζας. Αυτό επιτυγχάνεται με την επιτάχυνση των πρόδρομων ιόντων, τα οποία φτάνουν στην κυψελίδα πρόσκρουσης, σε διάφορες ενέργειες και τελικά την διάσπαση τους από επαγόμενη πρόσκρουση (C.I.D.: Collision Induced Dissociation) με τα άτομα του αργού.

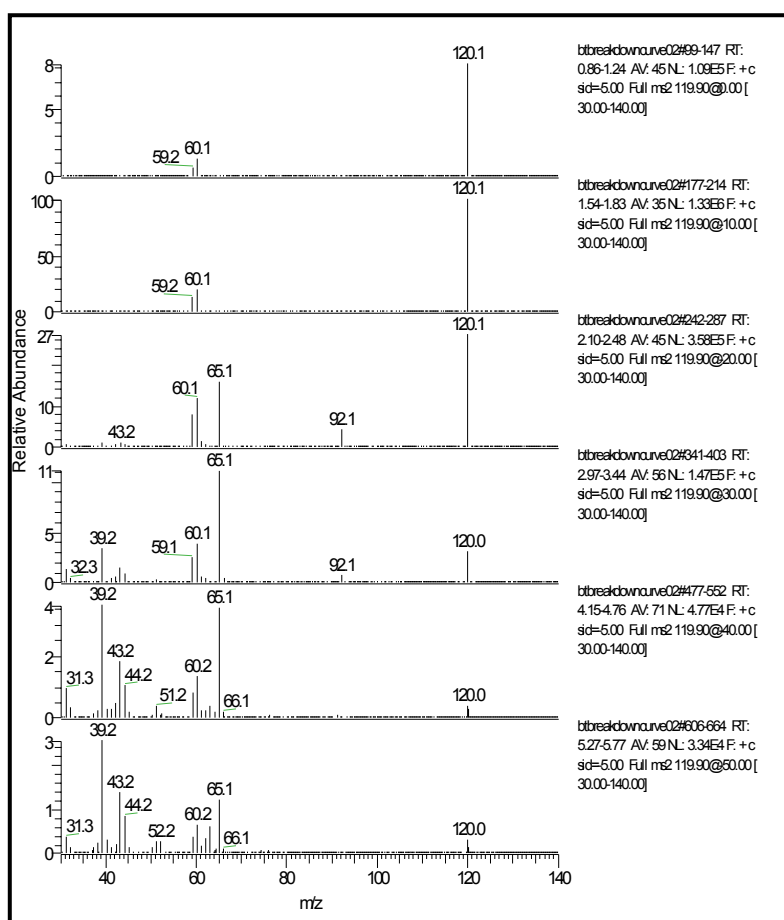
Σημαντικός παράγοντας για την διάσπαση των πρόδρομων ιόντων είναι και το δυναμικό φακών εστίασης (tube lens offset), το οποίο συμβάλλει κι αυτό στην επιτάχυνση των ιόντων προς την κυψελίδα πρόσκρουσης, και να συμβάλλει έτσι έμμεσα σε αποτελεσματικές συγκρούσεις μεταξύ των πρόδρομων ιόντων και των ατόμων του αερίου αργού. Στην περίπτωση που οι προαναφερθείσες συγκρούσεις είναι αποτελεσματικές, πραγματοποιείται θραυσματοποίηση των πρόδρομων ιόντων.

Οι βέλτιστες τιμές του δυναμικού φακών εστίασης καθώς και η ενέργεια διάσπασης στην πηγή, οι οποίες εφαρμόζονται ξεχωριστά για την κάθε ένωση, αναγράφονται στον Πίνακα 3.4:

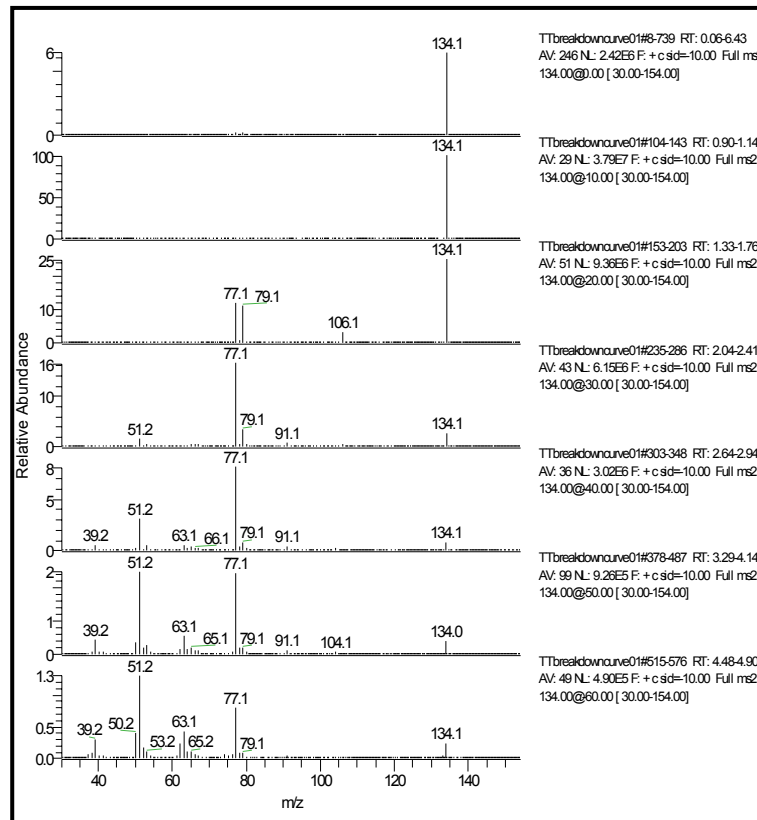
Πίνακας 3.4: Εφαρμοζόμενο δυναμικό φακών εστίασης (Tube lens offset) και ενέργεια διάσπασης στην πηγή (Source CID: source collision induced dissociation)

Ένωση	Δυναμικό φακών εστίασης (V)	Ενέργεια πρόσκρουσης (eV)
BZT	20	5
TTA	90	10
5,6-DM-BZT	84	10

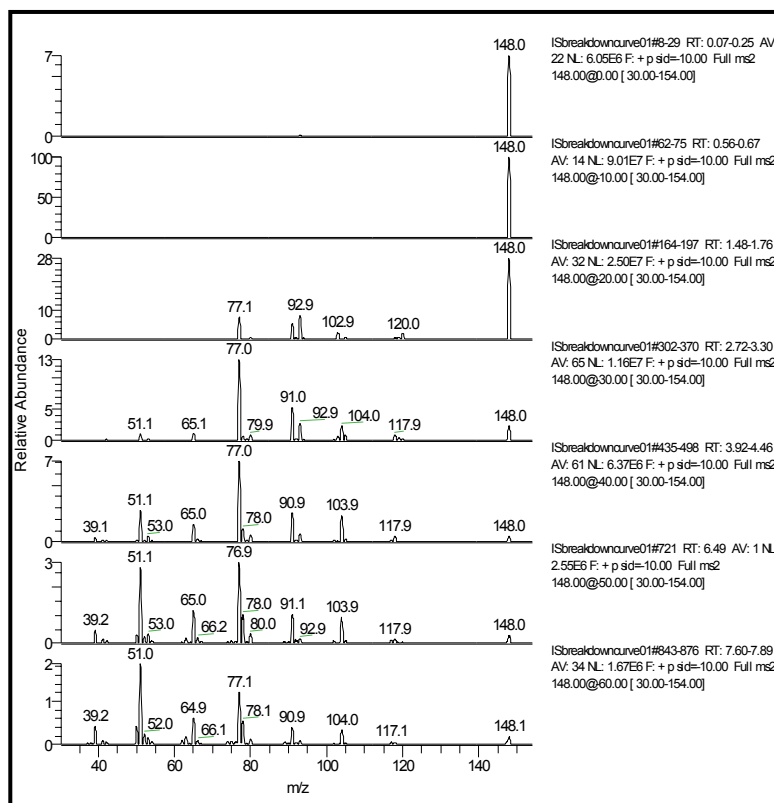
Εφαρμόζοντας την μέθοδο σάρωσης προϊόντων ιόντων για κάθε ένωση ξεχωριστά, από πρότυπο διάλυμα αυτής (1ppm), τα χρωματογραφήματα (σχετική αφθονία συναρτήσει του m/z) που λαμβάνονται είναι τα 3.3, 3.4, 3.5. Αξιζει να σημειωθεί ότι η μέθοδος αυτή δεν παρουσιάζει εκλεκτικότητα κι ευαισθησία μιας και ανιχνεύονται όλα τα ιόντα τα οποία προκύπτουν με τις προαναφερθείσες συνθήκες. Τα γραφήματα που ακολουθούν παριστάνουν, ξεχωριστά για την κάθε ένωση, τα παραγόμενα θραύσματα (m/z) συναρτήσει της αφθονίας τους. Όπως παρατηρείται για την κάθε ένωση προκύπτουν περισσότερα από ένα γραφήματα, αυτό συμβαίνει γιατί πρόκειται για το αποτέλεσμα το οποίο λαμβάνουμε κατά την εφαρμογή διαφορετικών ενεργειών πρόσκρουσης. Για παράδειγμα, για την ΒΖΤ εφαρμόζεται ενέργεια 0, 10, 20, 30, 40, 50 eV. Με τον τρόπο αυτό είναι εφικτός και ο υπολογισμός της βέλτιστης ενέργειας πρόσκρουσης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.1.5, αλλά και η επιλογή των παρακολουθούμενων θραυσμάτων.



Φάσμα 3.1: Σάρωση προϊόντων ιόντων της βενζοτριαζόλης



Φάσμα 3.2: Σάρωση προϊόντων ιόντων της τολυλτριαζόλης



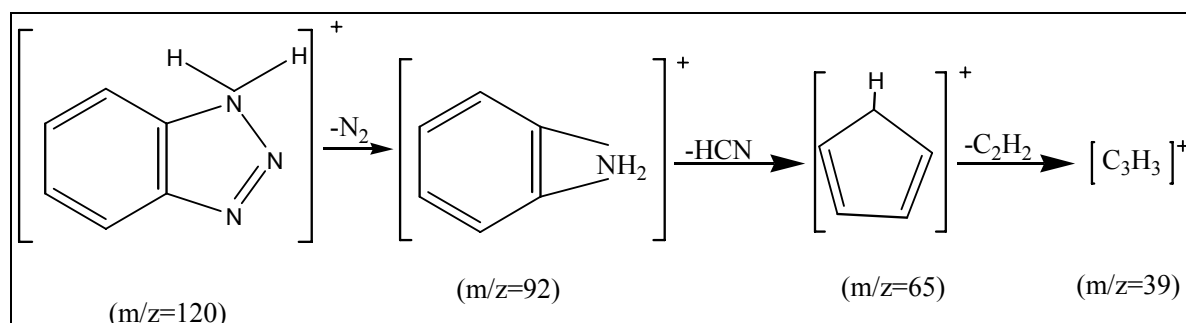
Φάσμα 3.3: Σάρωση προϊόντων ιόντων της 5,6-διμέθυλοβενζοτριαζόλης

Στηριζόμενοι στα παραπάνω φάσματα μάζας, επιλέξαμε τα ιόντα εκείνα τα οποία παρουσίαζαν την μεγαλύτερη αφθονία και τα οποία θα παρακολουθούνται κατά την SRM μέθοδο. Για την πρώτη ένωση γίνεται επιλογή τριών ιόντων ενώ για τις άλλες δύο γίνεται επιλογή τεσσάρων ιόντων. Η επιλογή περισσότερων από ένα θυγατρικών ιόντων για την κάθε ένωση ξεχωριστά, δίνει μεγαλύτερη ασφάλεια για το ότι η ένωση που παρακολουθούμε είναι όντως αυτή που μελετάμε κι όχι κάποια άλλη που πιθανώς θα έδινε ένα ίδιο θραύσμα. Τα ιόντα που επιλέγονται αναγράφονται στον Πίνακα 3.5:

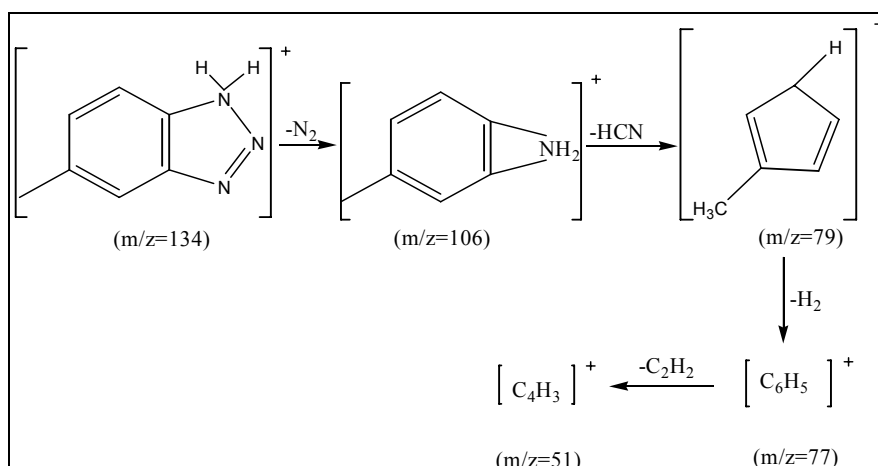
Πίνακας 3.5: Επιλογή θυγατρικών ιόντων.

	BZT [M+H] ⁺ : 120	TTA [M+H] ⁺ : 134	5,6-DM-BZT [M+H] ⁺ : 148
Θυγατρικά Ιόντα	39	39	39
m/z	65	51	51
	92	77	77
		79	91

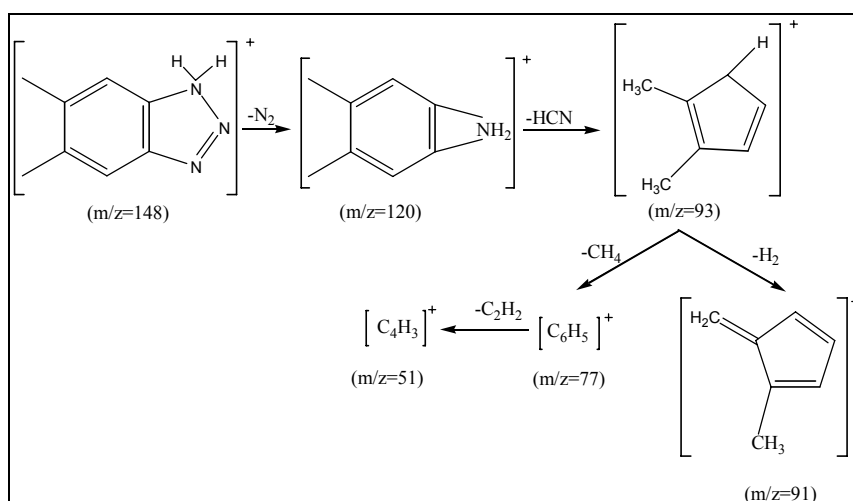
Ο ακριβής μηχανισμός θραυσματοποίησης καθώς και οι ακριβείς δομές των θραυσμάτων που προκύπτουν δεν είναι δυνατόν να προταθούν με μεγάλη ακρίβεια, κι αυτό συμβαίνει γιατί δεν έχουμε ακριβή εντοπισμό του φορτίου στις ενώσεις μας. Προτεινόμενοι μηχανισμοί θραυσματοποίησης είναι οι ακόλουθοι:



Σχήμα 3.1: Προτεινόμενος μηχανισμός θραυσματοποίησης της βενζοτρίαζόλης



Σχήμα 3.2: Προτεινόμενος μηχανισμός θραυσματοποίησης της τολυλτριαζόλης

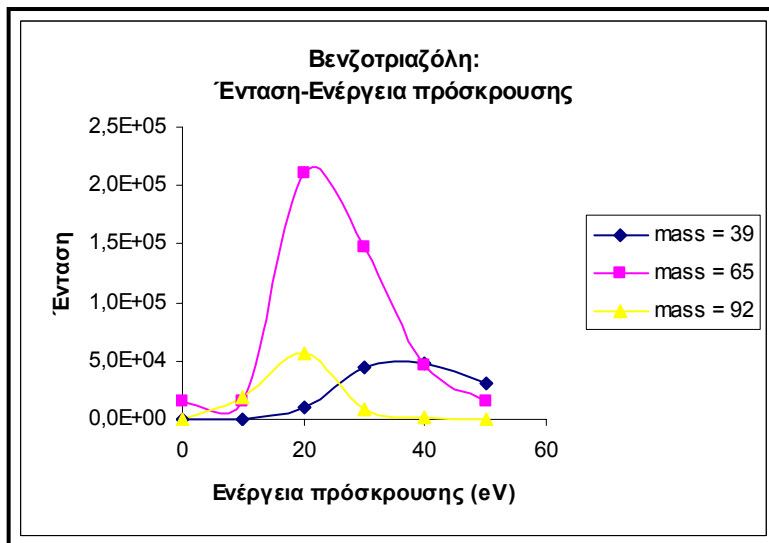


Σχήμα 3.3: Προτεινόμενος μηχανισμός θραυσματοποίησης της 5,6-διμέθυλο-βενζοτριαζόλης

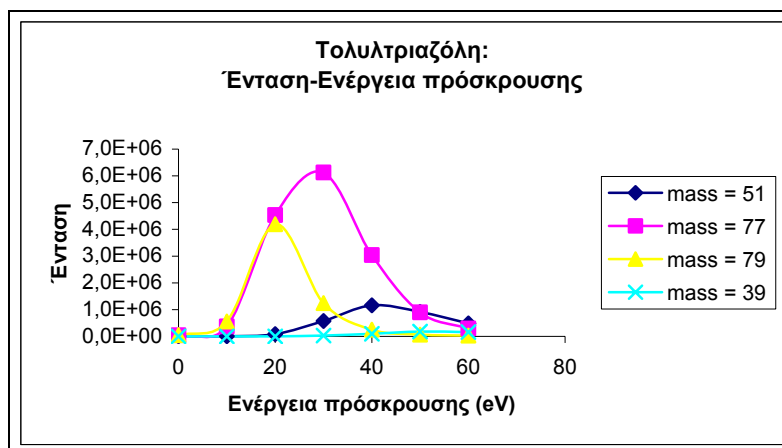
3.1.5. Προσδιορισμός βέλτιστης ενέργειας πρόσκρουσης

Η ενέργεια πρόσκρουσης (collision energy) αντιστοιχεί στην ενέργεια εκείνη η οποία εφαρμόζεται στο τετράπολο q2 το οποίο λειτουργεί σαν κυψελίδα πρόσκρουσης. Η βέλτιστη τιμή της ενέργειας πρόσκρουσης αντιστοιχεί στην ενέργεια εκείνη, στην οποία το κάθε θραύσμα παρουσιάζει μέγιστη αφθονία. Συνεπώς εφαρμόζοντας την συγκεκριμένη ενέργεια καταφέρνουμε να δούμε το προς παρακολούθηση ιόν στην μέγιστη αφθονία

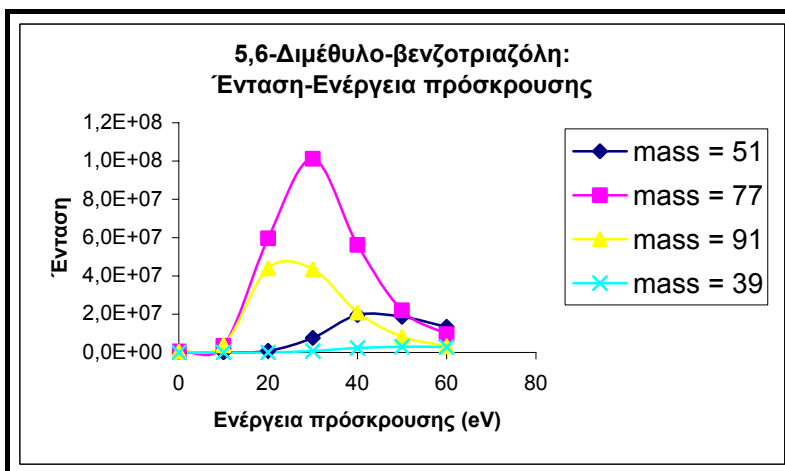
του. Προκειμένου να προσδιοριστεί η ενέργεια αυτή, παριστάνεται η αφθονία των ιόντων συναρτήσει της ενέργειας αυτής. Έτσι προκύπτουν τα διαγράμματα 3.1, 3.2 και 3.3:



Διάγραμμα 3.1: Βενζοτρίαζόλη (Ένταση - Ενέργεια πρόσκρουσης)



Διάγραμμα 3.2: Τολουτρίαζόλη (Ένταση - Ενέργεια πρόσκρουσης)



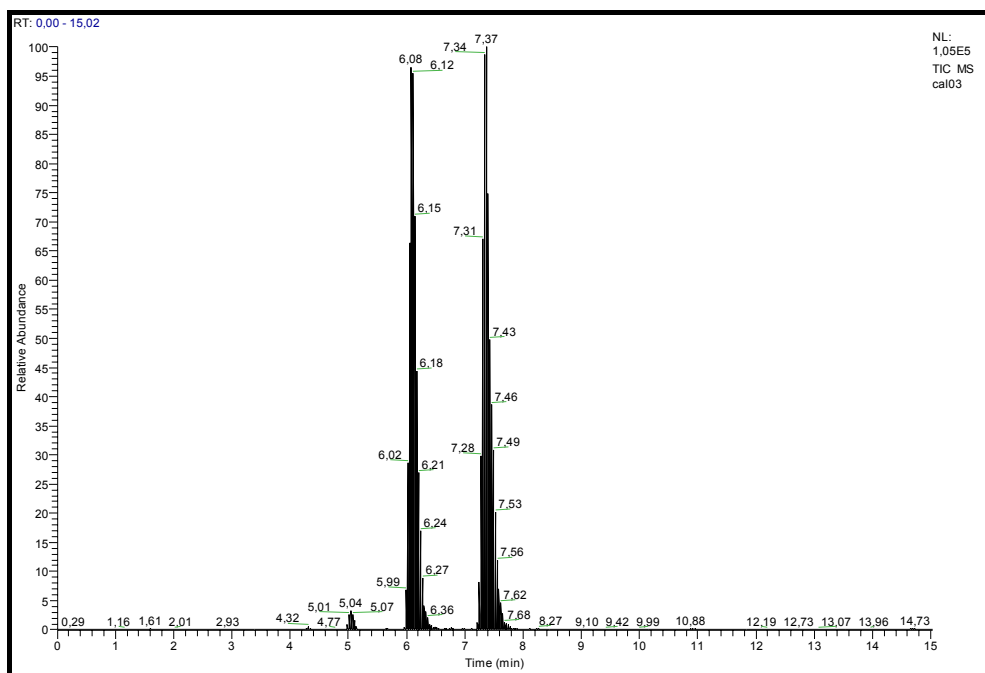
Διάγραμμα 3.3: 5,6-διμέθυλο-βενζοτρίαζόλη (Ένταση - Ενέργεια πρόσκρουσης)

Από τα παραπάνω γραφήματα προκύπτει ότι οι βέλτιστες τιμές της ενέργειας πρόσκρουσης για κάθε ένα θραύσμα είναι οι ακόλουθες:

Πίνακας 3.6: Βέλτιστη ενέργεια πρόσκρουσης για κάθε ένα θραύσμα

<u>ΘΡΑΥΣΜΑ</u>	<u>Ενέργεια πρόσκρουσης (eV)</u>
BZT: m/z 39	35
BZT: m/z 65	22
BZT: m/z 92	20
TTA: m/z 39	50
TTA: m/z 51	40
TTA: m/z 77	30
TTA: m/z 79	20
5,6-DM-BZT: m/z 39	50
5,6-DM-BZT: m/z 51	40
5,6-DM-BZT: m/z 77	30
5,6-DM-BZT: m/z 91	25

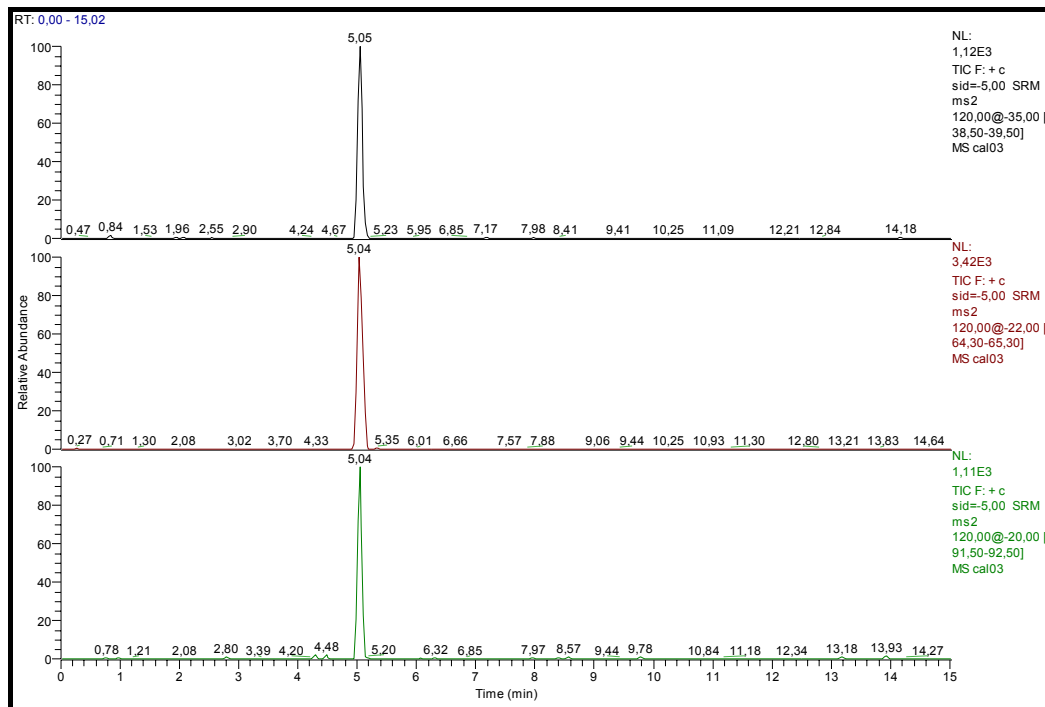
Με τις προαναφερθείσες συνθήκες, για ένα πρότυπο μίγμα των τριών ενώσεων (20ppb), λαμβάνεται το Χρωματογράφημα 3.6:



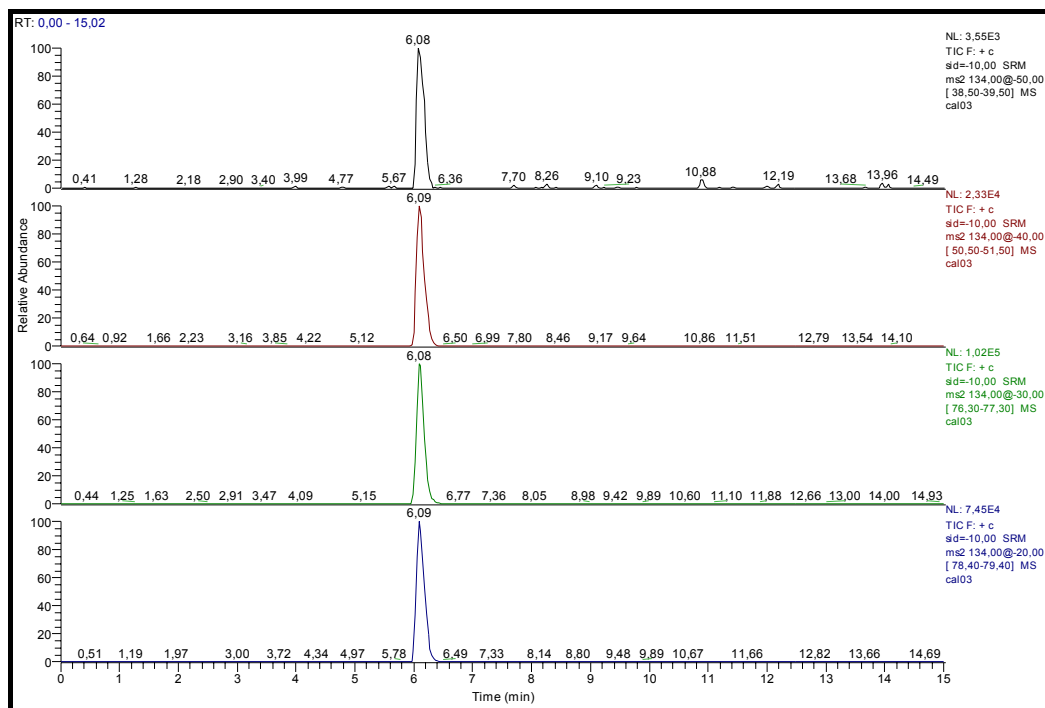
Χρωματογράφημα 3.3: Πρότυπο μίγμα των τριών ενώσεων (20ppb).

Στο χρωματογράφημα αυτό παριστάνεται η ένταση του σήματος συναρτήσει του χρόνου έκλουσης των τριών ενώσεων. Κάνοντας διαχωρισμό

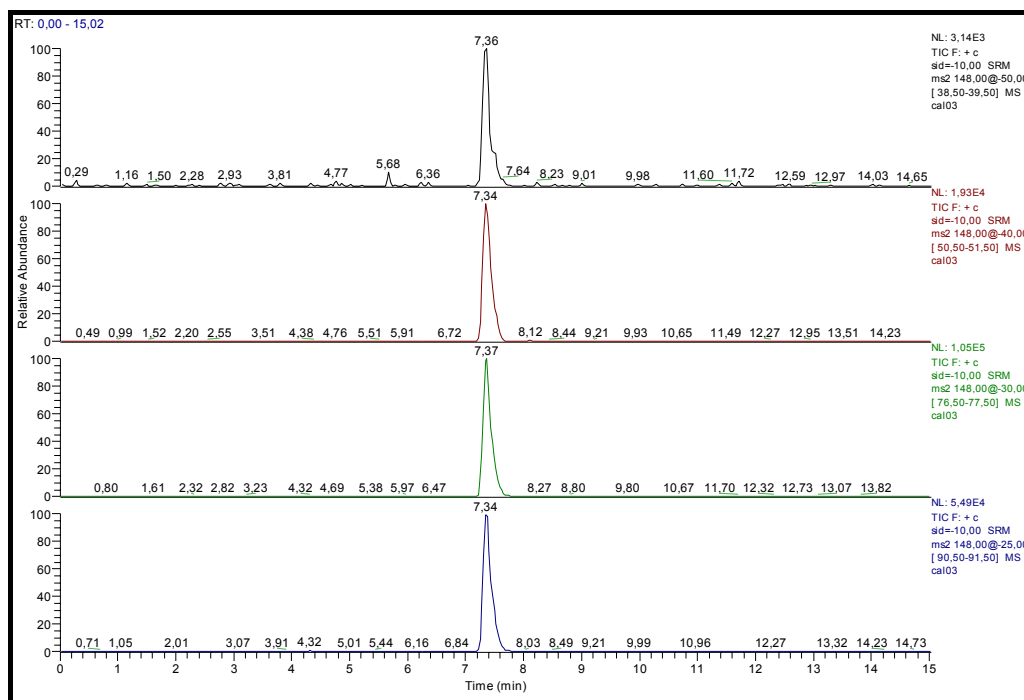
για την κάθε μία ένωση και παριστάνοντας ξεχωριστά τα θραύσματα, παίρνουμε τα ακόλουθα χρωματογράφημα ιόντων:



Χρωματογράφημα 3.4: Ιόντα βενζοτρίαζόλης



Χρωματογράφημα 3.5: Ιόντα τολυλτριαζόλης



Χρωματογράφημα 3.6: Ιόντα 5,6-διμέθυλο-βενζοτρίαζόλης

Συνοψίζοντας, τα μοριακά και θυγατρικά ιόντα καθώς και οι εφαρμοζόμενες τιμές για το δυναμικό φακών εστίασης, για την ενέργεια η οποία προκαλεί διάσπαση από επαγόμενη πρόσκρουση και για την ενέργεια πρόσκρουσης, αναγράφονται στον Πίνακα 3.7:

Πίνακας 3.7: Ιόντα και Βέλτιστες Συνθήκες παρακολούθησης τους κατά την μέθοδο S.R.M.

	m/z θυγατρικών ιόντων	Tube Lens Offset (V)	Source CID (eV)	Collision Energy (eV)
BZT ([M+H]⁺: 120) 	39	20	5	35
	65			22
	92			20
TTA ([M+H]⁺: 134) 	39	90	10	50
	51			40
	77			30
	79			20
5,6-DM-BZT ([M+H]⁺: 148) 	39	84	10	50
	51			40
	77			30
	91			25

3.2 Υπολογισμοί Ανάκτησης, Ορίων Ανίχνευσης, Ορίων Ανίχνευσης Μεθόδου, και Ορίων Ποσοτικοποίησης.

3.2.1. Υπολογισμός Συντελεστών Ανάκτησης

Για τον υπολογισμό του ποσοστού ανάκτησης των ενώσεων:

- Βενζοτρίαζόλη
- Τολουλτριαζόλη
- 5,6-διμέθυλο-βενζοτρίαζόλη

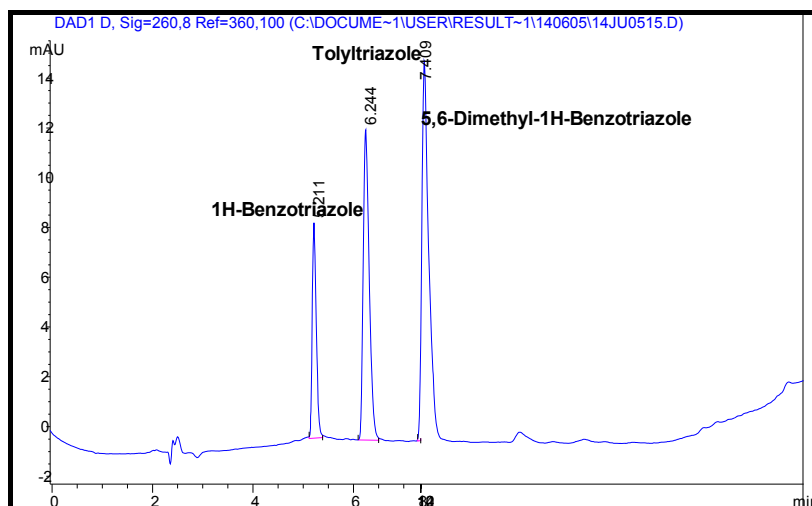
παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα μίγματος των ενώσεων αυτών, γνωστής συγκέντρωσης (20ppb) εις τριπλούν. Τα διαλύματα αυτά επεξεργάστηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με τον οποίο επεξεργάζεται ένα πραγματικό δείγμα και αναφέρεται στο τμήμα 2.3.3. Αυτό γίνεται έτσι ώστε να έχουμε μια πραγματική εικόνα για το τι απώλειες, όσον αφορά στις ενώσεις μας, έχουμε κατά την επεξεργασία του δείγματος.

Όπως προαναφέρθηκε τα τρία διαλύματα είχαν συγκέντρωση 20 ppb ενώ ο όγκος τους ήταν 250 ml. Αφού πραγματοποιήθηκαν όλα τα στάδια της επεξεργασίας (συμπεριλαμβανομένης και της συμπύκνωσης) ο τελικός τους όγκος έφτασε στα 3 ml. Αυτό σημαίνει ότι είχαμε καταφέρει μια συμπύκνωση (250ml→3ml): 83,3 φορές. Έτσι θα περιμέναμε στην περίπτωση που η ανάκτηση ήταν 100% να παίρναμε ένα σήμα στο σύστημα HPLC, το οποίο θα αντιστοιχούσε σε $(20\text{ppb} \times 83,3) = 1.666 \text{ ppb} = 1,666\text{ppm}$. Στην πραγματικότητα το σήμα που πήραμε ήταν μικρότερο, γεγονός αναμενόμενο μιας και η ανάκτηση επρόκειτο να είναι μικρότερη του 100%. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι τα διαλύματα παρασκευάστηκαν εις τριπλούν, ώστε να μπορεί να υπολογιστεί και η τυπική απόκλιση της υπολογιζόμενης συγκέντρωσης.

Προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση του διαλύματος το οποίο επεξεργάστηκε με τον τρόπο που αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, έγινε παρασκευή και μέτρηση στο σύστημα HPLC προτύπων διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,5, 1,0, 2,0, 4,0 ppm). Με την

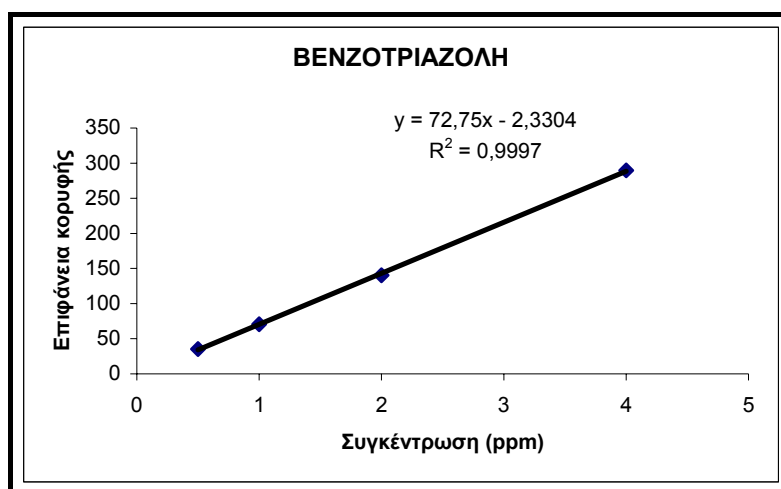
χρήση - μέτρηση αυτών των διαλυμάτων κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς (calibration curve). Η καμπύλη αυτή παριστάνει την επιφάνεια των κορυφών των τριών ενώσεων συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Ενδεικτικά παρουσιάζεται ένα από τα χρωματογραφήματα τα οποία ελήφθησαν από τα «άγνωστα» διαλύματα:

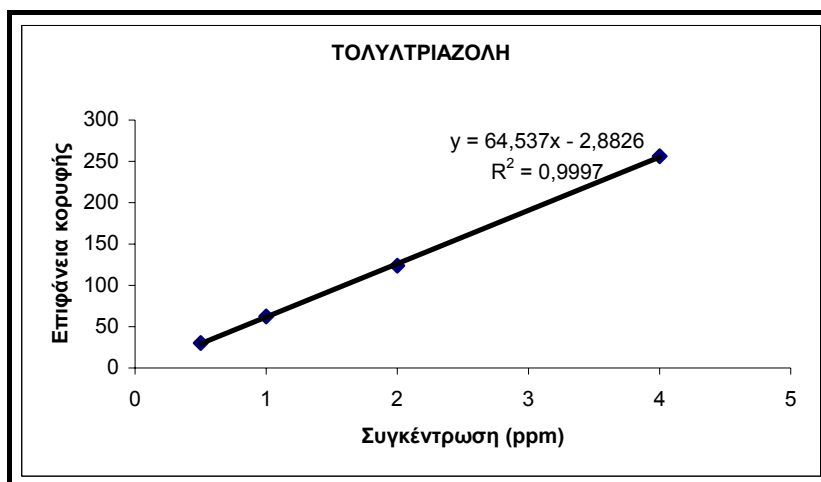


Χρωματογράφημα 3.7: Μίγμα των ενώσεων για τον υπολογισμό της ανάκτησης.

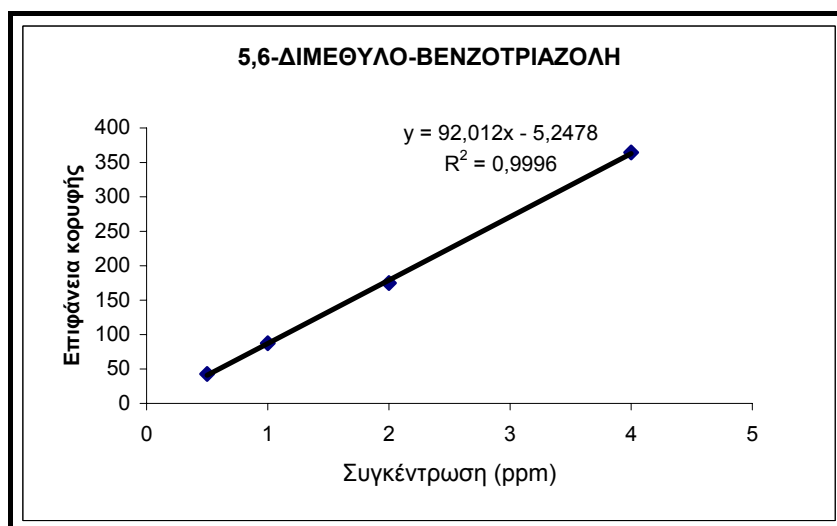
Ανάλογη εικόνα προκύπτει και για τα άλλα δύο δείγματα. Η σειρά με την οποία εκλούνται οι ενώσεις είναι αυτή που αναγράφεται στο Χρωματογράφημα 3.10, ενώ οι συνθήκες έκλουσης είναι αυτές που αναφέρονται στον Πίνακα 3.1. Οι καμπύλες βαθμονόμησης οι οποίες προκύπτουν από τα πρότυπα διαλύματα, φαίνονται στα διαγράμματα 3.4, 3.5 και 3.6:



Διάγραμμα 3.4: Καμπύλη αναφοράς για την βενζοτριαζόλη



Διάγραμμα 3.5: Καμπύλη βαθμονόμησης για την τολουλτριαζόλη



Διάγραμμα 3.6: Καμπύλη βαθμονόμησης για την 5,6-διμέθυλο-βενζοτριαζόλη

Με την χρήση των εξισώσεων οι οποίες προκύπτουν από τις καμπύλες αυτές:

► Βενζοτριαζόλη (BZT): $y = 72,75x - 2,3304$ (4.1)

► Τολουλτριαζόλη (ΤΤΑ): $y = 64,537x - 2,8826$ (4.2)

► 5,6-διμέθυλο-βενζοτριαζόλη (5,6-BZT): $y = 92,012x - 5,2478$ (4.3)

και με τα ολοκληρωμάτα των κορυφών των διαλυμάτων που προορίζονται για τον προσδιορισμό της ανάκτησης προκύπτουν τα αποτελέσματα που αναγράφονται στον ακόλουθο Πίνακα 3.8:

Πίνακας 3.8: Ποσοστό ανάκτησης

	BZT	ΤΤΑ	5,6-DM-BZT
	<i>Συγκέντρωση (ppm)</i>	<i>Συγκέντρωση (ppm)</i>	<i>Συγκέντρωση (ppm)</i>
<i>ανάκτηση 1</i>	0,371552	1,543031	1,702471
<i>ανάκτηση 2</i>	0,676707	1,660793	1,635089
<i>ανάκτηση 3</i>	0,517256	1,524437	1,636176
Μέσος όρος	0,521838	1,576087	1,657912
Τυπική απόκλιση	0,152629	0,073944	0,038593
% ανάκτηση	31,30%	94,60%	99,50%

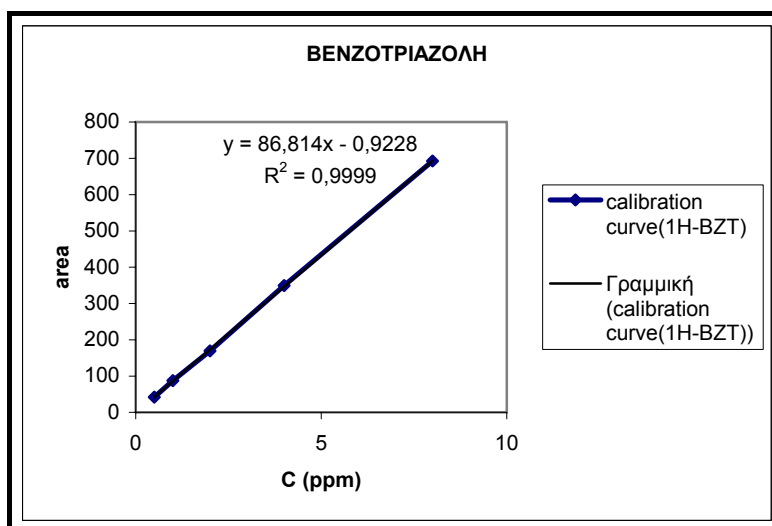
Όπως ήταν αναμενόμενο, οι προκύπτουσες - υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις είναι μικρότερες του 1,666 ppm, το οποίο θα ήταν το ιδανικό για ανάκτηση 100%. Επίσης το ποσοστό ανάκτησης που παρατηρείται για τις ενώσεις: τολουτριαζόλη, 5,6-διμέθυλο-βενζοτριαζόλη είναι απολύτως αποδεκτό του αναμενόμενου, ενώ για την βενζοτριαζόλη η τιμή που λαμβάνεται είναι αρκετά χαμηλότερη. Η χαμηλή αυτή τιμή μπορεί αφενός μεν να αποδοθεί στην λιγότερο υδρόφοβη δομή της σε σχέση με τις άλλες δύο, γεγονός που δεν της επιτρέπει να συγκρατηθεί σε τόσο μεγάλο βαθμό πάνω στο προσροφητικό υλικό του φυσίγγιου (cartridge) και αφετέρου στην μεγαλύτερη διαλυτότητα της στο νερό με αποτέλεσμα να παρασύρεται από την υδατική φάση και να μην συγκρατείται στο προαναφερόμενο προσροφητικό υλικό. Για τους ίδιους λόγους πιθανόν να υπάρχει διαφορά μεταξύ των ποσοστών ανάκτησης των δύο άλλων ενώσεων.

Προκειμένου να βελτιωθεί το ποσοστό ανάκτησης της βενζοτριαζόλης επαναλήφθηκε η παραπάνω διαδικασία. Σ' αυτήν τη περίπτωση δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στην ταχύτητα ροής (μικρότερη των 5 ml/min) κατά την διαβίβαση του διαλύματος από τα φυσίγγια (cartridges), κι αυτό γιατί κατά την προηγούμενη μελέτη για τον υπολογισμό του ποσοστού ανάκτησης, είχε παρατηρηθεί βλάβη στην συσκευή (manifold) όπου τοποθετούνται τα φυσίγγια, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγαλύτερη του επιτρεπτού ροή διαλύματος. Έτσι τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν καθώς και η

καμπύλη βαθμονόμησης η οποία χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση αυτή φαίνονται ακολούθως:

Πίνακας 3.9: Ποσοστό ανάκτησης της βενζοτριαζόλης

Δείγμα Βενζοτριαζόλης	Συγκέντρωση (ppm)
ανάκτηση_1	0,999429
ανάκτηση_2	1,572797
ανάκτηση_3	1,513613
Μέσος όρος	1,361946
Τυπική απόκλιση	0,315341
% ανάκτηση	81,74946



Διάγραμμα 3.7: Καμπύλη αναφοράς 2 για την βενζοτριαζόλη

Είναι φανερή η μεταβολή του ποσοστού ανάκτησης της BZT, γεγονός που μαρτυρεί την σημαντικότητα της ταχύτητας ροής κατά την διέλευση ενός δείγματος από τα φυσιγγία (διαδικασία εκχύλισης στερεάς φάσης).

Τα τελικά αποτελέσματα τα οποία ισχύουν για το ποσοστό ανάκτησης της κάθε ένωσης είναι τα ακόλουθα:

Πίνακας 3.10: % ποσοστά ανάκτησης

	BZT (n=3)	ΤΓΑ (n=3)	5,6-DM-BZT (n=3)
% ποσοστό ανάκτησης	81,8 ± 9,2	94,6 ± 4,2	99,5 ± 2,4

3.2.2. Έλεγχος της επαναληψιμότητας για την τεχνική HPLC

Προκειμένου να διασφαλιστεί η ποιότητα των αποτελεσμάτων τα οποία ελήφθησαν με χρήση της αναλυτικής τεχνικής HPLC-UV, μελετήθηκε η επαναληψιμότητα η οποία παρατηρείται με χρήσης αυτής. Η επαναληψιμότητα (**repeatability**) αποτελεί τον βαθμό της αμοιβαίας συμφωνίας μεταξύ δεδομένων τα οποία λαμβάνονται με τον ίδιο τρόπο και περιγράφει την μεταβλητότητα μεταξύ αριθμητικών τιμών ενός αριθμού επαναλαμβανόμενων μετρήσεων που λαμβάνονται με την ίδια ακριβώς αναλυτική μέθοδο την ίδια χρονική περίοδο.

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας ελήφθησαν 7 συνεχόμενες (την ίδια μέρα) μετρήσεις ενός μίγματος των τριών ενώσεων συγκέντρωσης 5 ppm. Στην συνέχεια έγινε υπολογισμός της τυπικής απόκλισης (standard deviation), και τα αποτελέσματα που προέκυψαν απεικονίζονται στον Πίνακα 3.11:

Πίνακας 3.11: Έλεγχος επαναληψιμότητας της τεχνικής HPLC-UV

Αρ. Δειγμ.	BZT	ΤΤΑ	5,6-DM-BZT
1	367,3	341,4	281,9
2	368,4	341,9	282,8
3	368,6	342,2	282,5
4	368,1	341,9	283,0
5	367,1	341,9	282,0
6	367,7	341,5	282,2
7	368,8	342,8	283,0
Μέσος όρος	368,0	341,9	282,5
Τυπική απόκλιση	0,6	0,5	0,5

Μέτρο της επαναληψιμότητας αποτελεί η τυπική απόκλιση (standard deviation), η οποία όπως παρατηρείται στον προηγούμενο πίνακα παίρνει μικρή τιμή για όλες τις ενώσεις. Μπορούμε λοιπόν να γίνει η παραδοχή ότι τα αποτελέσματα τα οποία λαμβάνονται με χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου παρουσιάζουν επαναληψιμότητα.

3.2.3. Υπολογισμός του ορίου ανίχνευσης για το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Το όριο ανίχνευσης (I.D.L.: Instrument Detection Limit) του συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC: High Performance Liquid Chromatography), αντιστοιχεί στην μικρότερη εκείνη συγκέντρωση ή ποσότητα του μετρούμενου συστατικού, που μπορεί να προσδιορισθεί με αξιοπιστία από το συγκεκριμένο όργανο HPLC, με καθορισμένη στάθμη εμπιστοσύνης. [48]

Ο υπολογισμός του ορίου ανίχνευσης υπολογίστηκε τόσο για $S/N=3$ όσο και για $S/N=5$ ($S/N=\text{signal}/\text{noise}$). Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν αναγράφονται στον Πίνακα 3.12:

Πίνακας 3.12: Όριο ανίχνευσης (I.D.L.) για το σύστημα υγρής χρωματογραφίας HPLC

<u>Ένωση</u>	<u>S/N=3</u>	<u>S/N=5</u>
Βενζοτρίαζόλη	10 ppb	15 ppb
Τολουλτριαζόλη	13 ppb	20 ppb
5,6-διμέθυλο-βενζοτρίαζόλη	20 ppb	25 ppb

3.2.4. Υπολογισμός ορίου ανίχνευσης της μεθόδου

Ο υπολογισμός του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου (M.D.L.: Method Detection Limit) γίνεται λαμβάνοντας υπόψη το I.D.L., το επί τοις εκατό ποσοστό ανάκτησης της μεθόδου και τέλος τον βαθμό στον οποίο έγινε συμπύκνωση του δείγματος. Μιλώντας για βαθμό συμπύκνωσης του δείγματος εννοούμε ότι για ένα δείγμα το οποίο ξεκίνησε από 250 ml και συμπυκνώθηκε μέχρι τελικού όγκου 3 ml, η συμπύκνωση ήταν 83,3 φορές.

Το M.D.L. λοιπόν υπολογίζεται βάσει αυτού του τρόπου και τα αποτελέσματα που προκύπτουν αναγράφονται στον Πίνακα 3.13:

Πίνακας 3.13: Όριο ανίχνευσης της μεθόδου (M.D.L.) με χρήση του συστήματος υγρής χρωματογραφίας HPLC

Όριο ανίχνευσης μεθόδου (Method Detection Limit: MDL)				
S/N=3				
	I.D.L. (ppb)	% ανάκτηση	Βαθμός συμπύκνωσης	M.D.L. (ppb)
BZT	10	81.75	83.3	0.15
TTA	13	94.60	83.3	0.16
5,6-DM-BZT	20	99.50	83.3	0.24
S/N=5				
	I.D.L. (ppb)	% ανάκτηση	Βαθμός συμπύκνωσης	M.D.L. (ppb)
BZT	15	81.75	83.3	0.22
TTA	20	94.60	83.3	0.25
5,6-DM-BZT	25	99.50	83.3	0.30

3.2.5. Προσδιορισμός ορίου ανίχνευσης των τριαζολών με χρήση του συστήματος υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με την φασματομετρία μάζας

Ο υπολογισμός του ορίου ανίχνευσης του οργάνου, γίνεται με την χρήση των ακόλουθων μαθηματικών τύπων:[49]

$$A = \text{blank} + 3 * SD \quad (4.1)$$

$$IDL = A * \frac{C_{std}}{A_{std}} \quad (4.2)$$

όπου:

SD= τυπική απόκλιση (standard deviation) τυφλού

Cstd= συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος (concentration-standard solution= 10ppb)

Astd= εμβαδόν προτύπου (area of the standard)

blank= εμβαδόν τυφλού (area of the blank)

LOD= όριο ανίχνευσης (limit of detection)

Ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης, γίνεται βάσει των παραπάνω τύπων αφού μετρηθούν 3 διαλύματα blanks (methanol÷water=1÷1), και υπολογιστεί η επιφάνεια που αντιστοιχεί στον χρόνο που αναμένεται να εμφανιστούν οι ενώσεις. Ενώ το SD αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση των τριών αυτών μετρήσεων.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την επεξεργασία των δεδομένων τα οποία προκύπτουν από τις μετρήσεις που προαναφέρθηκαν, για κάθε θραύσμα ξεχωριστά, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.15.

Πίνακας 3.14: Όρια ανίχνευσης θραυσμάτων

	ΘΡΑΥΣΜΑ	blank 1	blank 2	blank 3	average	Stdev	Cstd= 10ppb	Astd	A=blank+3SD	IDL= A*(Cstd/Astd) (ppb)
BZT	39	127	157	474	252,67	192,270	10	3330	829,466	2,491
	65	737	920	663	773,33	132,300	10	12000	1170,220	0,975
	92	162	352	348	287,33	108,560	10	4390	613,014	1,396
TTA	39	676	523	606	601,67	76,592	10	1280	831,443	6,496
	51	961	780	639	793,33	161,410	10	9950	1277,570	1,284
	77	3870	2930	1950	2916,7	960,070	10	34400	5796,870	1,685
	79	1600	805	874	1093	440,430	10	30200	2414,280	0,799
5,6-DM- BZT	39	133	32,5	25,8	63,767	60,051	10	4010	243,921	0,608
	51	7,15	6,36	4,43	5,98	1,399	10	24000	10,178	0,004
	77	101	40,1	19,9	53,667	42,218	10	120000	180,320	0,015
	91	19,7	13,6	10,1	14,467	4,858	10	66800	29,042	0,004

Θέλοντας να αναφερθούμε στο όριο ανίχνευσης μίας ένωσης και όχι για κάθε θραύσμα ξεχωριστά, επιλέγουμε την καλύτερη από τις παραπάνω τιμές (το πιο χαμηλό I.D.L). Συνεπώς τα όρια ανίχνευσης για την κάθε μία ένωση, με χρήση του συστήματος υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με διαδοχική φασματομετρία μάζας, είναι αυτά που αναγράφονται στον Πίνακα 3.16.

Πίνακας 3.15: Όρια ανίχνευσης των ενώσεων στο MS

Ένωση	I.D.L. (ppb)
Βενζοτρίαζόλη	0,975
Τολουτρίαζόλη	0,799
5,6-διμέθυλο-βενζοτρίαζόλη	0,004

3.2.6. Προσδιορισμός ορίου ανίχνευσης της μεθόδου με χρήση του συστήματος υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με διαδοχική φασματομετρία μάζας

Ο υπολογισμός του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου γίνεται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.4., τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι τα ακόλουθα:

Πίνακας 3.16: Όρια Ανίχνευσης της Μεθόδου

	I..D.L. (ppb)	% ανάκτηση	Βαθμός συμπύκνωσης	M.D.L. (ppb)
BZT	0,975	81,75	83,3	0,014
TTA	0,799	94,60	83,3	0,010
5,6-DM-BZT	0,004	99,50	83,3	5,245*10 ⁻⁵

3.2.7. Προσδιορισμός Ορίου Ποσοτικοποίησης

Το όριο ποσοτικοποίησης (L.O.Q.: Limit of Quantification) αντιστοιχεί στην μικρότερη συγκέντρωση στην οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί ποσοτική μέτρηση. Ο υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης γίνεται με την χρήση των ακόλουθων τύπων [50]:

$$A = \text{blank} + 10 * SD \quad (4.3)$$

$$LOQ = A * \frac{C_{std}}{A_{std}} \quad (4.4)$$

όπου:

SD= τυπική απόκλιση (standard deviation)

Cstd= συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος (concentration-standard solution= 10ppb)

Astd= εμβαδόν πρότυπου (area of the standard)

blank= εμβαδόν τυφλού (area of the blank)

LOQ= όριο ανίχνευσης (limit of quantification)

Ο προσδιορισμός του L.O.Q., γίνεται βάσει των παραπάνω τύπων αφού μετρηθούν 10 διαλύματα blanks (methanol÷water=1÷1), και υπολογιστεί η επιφάνεια που αντιστοιχεί στον χρόνο που αναμένεται να εμφανιστούν οι ενώσεις. Ενώ το SD αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση αυτών των δέκα μετρήσεων.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την επεξεργασία των δεδομένων τα οποία προκύπτουν από τις μετρήσεις που προαναφέρθηκαν, για κάθε θραύσμα ξεχωριστά, παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 3.17:

Πίνακας 3.17: Όρια Ποσοτικοποίησης (L.O.Q.) στο MS

	ΘΡΑΥΣΜΑ	average (area)	st.dev.	Cstd= 10ppb	Astd	A=blank+10SD	LOQ= A*(Cstd/Astd) ppb
BZT	39	26,636	25,8136	10	1650	284,772	1,726
	65	17,193	22,9959	10	4600	247,152	0,537
	92	24,042	23,4	10	1330	258,042	1,940
TTA	39	179,27	139,156	10	665	1570,828	23,621
	51	46,18	38,9362	10	4780	435,542	0,911
	77	165,53	57,7636	10	17600	743,166	0,422
	79	239,8	128,667	10	14800	1526,466	1,031
5,6-DM-BZT	39	40,228	41,6468	10	4010	456,696	1,139
	51	10,444	8,49538	10	24000	95,3978	0,040
	77	67,25	45,7353	10	120000	524,603	0,044
	91	24,718	22,6291	10	66800	251,009	0,038

3.3. Μέθοδος προσθήκης γνωστών ποσοτήτων και έλεγχος ύπαρξης παρεμπόδισης μήτρας (*matrix effect*)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των τριαζολών γίνεται με την μέθοδο προσθήκης γνωστών ποσοτήτων (*standard addition method*). Γενικά, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις που είναι αδύνατη η παρασκευή προτύπων διαλυμάτων παρόμοιας συστάσεως με τα διαλύματα των αγνώστων, είτε επειδή είναι άγνωστη η σύσταση τους ή ποικίλλει από δείγμα σε δείγμα, είτε επειδή υπάρχουν ουσίες που παρεμποδίζουν. Κατά την μέθοδο αυτή, αναλύεται το διάλυμα του αγνώστου δείγματος και στη συνέχεια αναλύεται το ίδιο ή άλλο τμήμα του διαλύματος του δείγματος, στο οποίο έχει προστεθεί μικρός όγκος προτύπου διαλύματος, ώστε να προκαλέσει αύξηση της συγκέντρωσης του συστατικού κατά ΔC με μικρή ή αμελητέα αύξηση του όγκου.

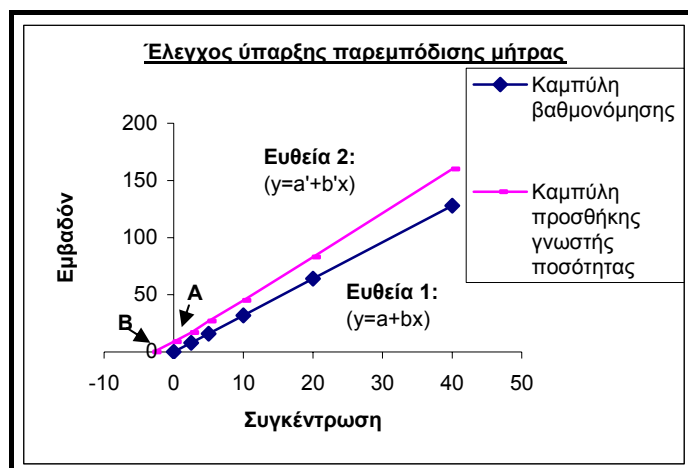
Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του αγνώστου γίνεται είτε γραφικά, οπότε κατασκευάζεται διάγραμμα της αναλυτικής παραμέτρου P (π.χ. ένταση, ολοκλήρωμα) ως προς τη μεταβολή της συγκέντρωσης ΔC , που προκλήθηκε με την προσθήκη ή προσθήκες στο διάλυμα του αγνώστου, και βρίσκεται η τομή της προκύπτουσας ευθείας με τη προέκταση του άξονα των προσθηκών είτε υπολογιστικά από διάφορους τύπους.[51]

Πιο συγκεκριμένα, κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των τριαζολών με χρήση του συστήματος HPLC-ESI-MS/MS έγινε χρήση της μεθόδου προσθήκης γνωστής ποσότητας κι αυτό γιατί τα δείγματα τα οποία λάβαμε από τον (Σ.Β.Ε.Λ.) παρουσίαζαν παρεμπόδιση μήτρας (*matrix effect: M.E.*). Με τον όρο *matrix effect* (M.E.), χαρακτηρίζονται οι φυσικές παρεμποδισίες (επίδραση μήτρας) που οφείλονται στην αλλαγή των φυσικών ιδιοτήτων του διαλύματος (ιξώδους, πυκνότητας, επιφανειακής τάσεως, τάσεως ατμών διαλύματος) από ηλεκτρολύτες ή οργανικές ουσίες. Οι αλλαγές αυτές συνεπάγονται μεταβολές στην αποδοτικότητα της εκνεφώσεως και του ψεκασμού, κι αυτό γιατί στην περίπτωση που η παρεμποδίζουσα ουσία είναι επιφανειοδραστική καταλαμβάνει χώρο πάνω στην σταγόνα κατά τον

ηλεκτροφεκασμό και παρεμποδίζει την ουσία που μας ενδιαφέρει να περάσει στην αέρια ιονισμένη μορφή της, και συνεπώς το σήμα που λαμβάνουμε γι' αυτήν είναι μικρότερο από το πραγματικό.

Στην παρούσα εργασία ο έλεγχος της ύπαρξης του Μ.Ε. και εν συνεχεία η χρήση της μεθόδου προσθήκης γνωστής ποσότητας στο δείγμα για τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των τριαζολών, έγινε ακολουθώντας τα παρακάτω βήματα:

1. Πραγματοποιούνται μετρήσεις προτύπων διαλυμάτων διαφόρων συγκεντρώσεων (π.χ. 2,5, 5,0, 10,0, 20,0, 40,0 ppb και ένα τυφλό), και βάσει των δεδομένων που προκύπτουν (ολοκληρώματα) γίνεται κατασκευή καμπύλης αναφοράς. Στην καμπύλη αυτή παριστάνεται το ολοκλήρωμα που λαμβάνεται από κάθε δείγμα συναρτήσει της συγκέντρωσης. Η καμπύλη αυτή ($y=a+bx$) αντιστοιχεί στην ευθεία 1 του διαγράμματος 5.1.
2. Λαμβάνεται ποσότητα του πραγματικού δείγματος και μετριέται με την χρήση της ίδιας μεθόδου (το σήμα που λαμβάνεται αντιστοιχεί στο σημείο Α του διαγράμματος 5.1).
3. Στην συνέχεια λαμβάνονται ποσότητες του πραγματικού δείγματος (δείγμα βιολογικού) και προστίθεται σ' αυτό ποσότητα από πρότυπο διάλυμα με τρόπο ώστε να πετύχουμε προσθήκες ίδιων συγκεντρώσεων με αυτές που κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς (2,5, 5,0, 10,0, 20,0, 40,0 ppb). Επίσης η προσθήκη γίνεται με τρόπο τέτοιο ώστε να μην πραγματοποιείται σημαντική αλλαγή του όγκου γιατί έτσι θα προκαλούνταν αραιώση της παρεμπόδισης μήτρας (Μ.Ε.), αυτό επιτυγχάνεται με χρήση προτύπων διαλυμάτων υψηλής συγκέντρωσης.
4. Από τα δεδομένα που λαμβάνονται κατά την μέτρηση των παραπάνω δειγμάτων, κατασκευάζεται δεύτερη καμπύλη (ευθεία 2: $y=a'+b'x$), και η οποία παριστάνεται στο διάγραμμα 3.8.



Διάγραμμα 3.8: Μελέτη ύπαρξης παρεμπόδισης μήτρας (matrix effect) και υπολογισμός ποσότητας με την μέθοδο προσθήκης γνωστής ποσότητας.

Εάν το ποσοστό επί τοις εκατό της διαφοράς των κλίσεων των δύο καμπυλών είναι μικρότερο του 10%, τότε θεωρείται ότι δεν υπάρχει παρεμπόδιση μήτρας και ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων μπορεί να γίνει με χρήση της καμπύλης βαθμονόμησης κατά τον γνωστό τρόπο. Στην περίπτωση όμως που το παραπάνω ποσοστό είναι μεγαλύτερο του 10%, τότε η πραγματική ποσότητα των ενώσεων που μελετάμε αντιστοιχεί στο σημείο $x=-a'/b'$ (απόλυτη τιμή), όπου η γραμμή 2 τέμνει τον οριζόντιο άξονα.

Παρατήρηση: Η παραπάνω διαδικασία διεξάγεται για κάθε στάδιο δειγματοληψίας του βιολογικού σταθμού (υγρή φάση) για κάθε ένα επιλεγμένο ιόν ξεχωριστά. Εφαρμογή των προαναφερθέντων γίνεται στον πίνακα 3.20.

3.4. Εφαρμογή αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό τριαζολών σε δείγματα του σταθμού βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων και σε εμπορικά δείγματα

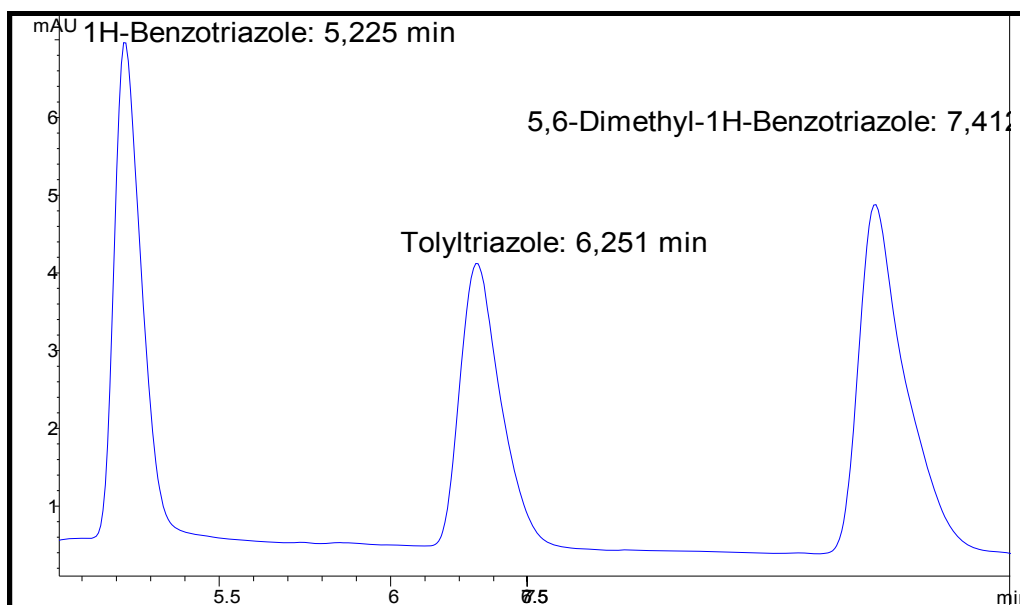
Ο ποσοτικός προσδιορισμός των τριαζολών επιτυγχάνεται με χρήση του συστήματος HPLC-ES-MS/MS και όχι με HPLC εξ' αιτίας του χαμηλού ορίου ανίχνευσης, της υψηλής ακρίβειας κι ευαισθησίας αλλά και υψηλής εκλεκτικότητας τα οποία διαθέτει. Άλλωστε η μέθοδος SRM, η οποία έχει αναπτυχθεί στο Κεφ. 3.1.3, επιτρέπει την ανίχνευση των αντιπροσωπευτικών για κάθε ένωση ιόντων χωρίς να αφήνει ίχνη αμφιβολίας για το αν πρόκειται γι' αυτήν την ένωση ή κάποια άλλη.

3.4.1. 1η-Δειγματοληψία

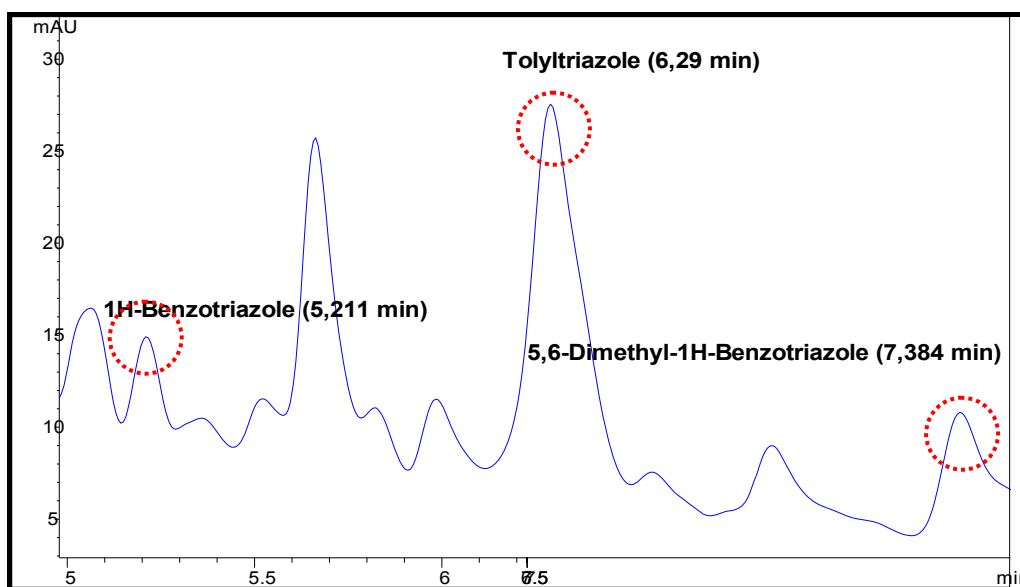
Ο ποσοτικός προσδιορισμός στην δειγματοληψία αυτή (29/03/05) έγινε με χρήση καμπύλης βαθμονόμησης, δεν μελετήθηκε και δεν λήφθηκε υπόψη η παρουσία παρεμπόδισης μήτρας. Έτσι ο ποσοτικός προσδιορισμός στο στάδιο αυτό είναι προσεγγιστικός, ενώ περισσότερη έμφαση δόθηκε στο αν οι τριαζόλες υπήρχαν στα δείγματα αυτά. Η δειγματοληψία έγινε από όλα τα στάδια επεξεργασίας του βιολογικού σταθμού τα οποία αναγράφονται στον Πίνακα 3.19. Το διάγραμμα ροής που ισχύει για την εγκατάσταση του βιολογικού σταθμού επεξεργασίας λυμάτων του Ηρακλείου φαίνεται στο Σχήμα 1.7.

Αξιζει να σημειωθεί ότι πριν να γίνει η ανάλυση στο σύστημα HPLC-ES-MS/MS τα δείγματα αυτά μελετήθηκαν στην υγρή χρωματογραφία HPLC όπου και παρατηρήθηκαν κορυφές των οποίων ο χρόνος έκλουσης φαινόταν να συμπίπτει με τους χρόνους έκλουσης των προς ανάλυση ουσιών. Για του λόγου το αληθές παρατίθενται ακολούθως δύο χρωματογραφήματα τα οποία έχουν ληφθεί με χρήση του συστήματος HPLC. Το Χρωματογράφημα 3.11 αντιστοιχεί σε ένα πρότυπο δείγμα των τριαζολών (0,5 ppm), ενώ το

Χρωματογράφημα 3.12 αντιστοιχεί σε ένα δείγμα του βιολογικού σταθμού επεξεργασίας λυμάτων από το στάδιο της εισόδου (υγρή φάση).



Χρωματογράφημα 3.8: Μίγμα πρότυπων ουσιών (0,5 ppm)



Χρωματογράφημα 3.9: Δείγμα εισόδου βιολογικού σταθμού επεξεργασίας λυμάτων

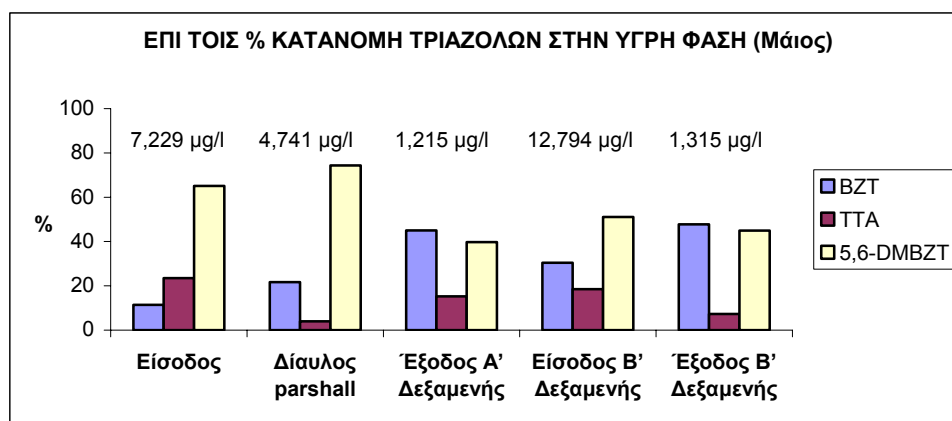
Είναι προφανής η ομοιότητα των χρόνων έκλουσης των προτύπων ενώσεων με αυτές που προκύπτουν από το δείγμα της εισόδου. Τελικά ο ποιοτικός και ο ποσοτικός προσδιορισμός των τριαζολών έγινε χρήση του συστήματος HPLC-ESI-MS/MS, για τους λόγους που αναφέρθηκαν στο

τμήμα 3.1. Τα στάδια δειγματοληψίας καθώς και η συγκέντρωση των τριαζολών σε κάθε δείγμα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.18.

Πίνακας 3.18: Ποσοτικός προσδιορισμός της ΒΖΤ, της ΤΤΑ και της 5,6-DM-BΖΤ σε διάφορα στάδια επεξεργασίας λυμάτων από τον Σταθμό Βιολογικής Επεξεργασίας Λυμάτων (Σ.Β.Ε.Λ.) του Ηρακλείου (29/3/2005).

Μάιος	ΒΖΤ	ΤΤΑ	5,6-διμέθυλο-ΒΖΤ
Είσοδος (μg/l)	0,823	1,699	4,707
Διάλυλος parshall (μg/l)	1,028	0,188	3,525
Έξοδος Α' ΔΚ (μg/l)	0,547	0,185	0,483
Είσοδος Β' ΔΚ (μg/l) <i>Πριν την χλωρίωση</i>	3,895	2,367	6,532
Έξοδος Β' ΔΚ (μg/l) <i>Μετά την χλωρίωση</i>	0,628	0,096	0,591
Α' Λάσπη (μg/g)	0,003	0,003	0,467
Β' Λάσπη (μg/g)	0,002	0,003	0,044
Αφυδατωμένη Λάσπη (μg/g)	0,003	0,006	0,381

Λαμβάνοντας τα παραπάνω δεδομένα και επιχειρώντας να παραστήσουμε γραφικά την επί τοις εκατό κατανομή των τριαζολών στα διάφορα στάδια επεξεργασίας, προκειμένου να διεξαχθούν συμπεράσματα όσον αφορά την παρουσία, την κατανομή και την συμπεριφορά των ενώσεων αυτών, προκύπτουν τελικά τα διαγράμματα 5.1 και 5.2. Τα διαγράμματα αυτά αντιστοιχούν στην κατανομή των τριαζολών στην υγρή και στην σωματιδιακή φάση.

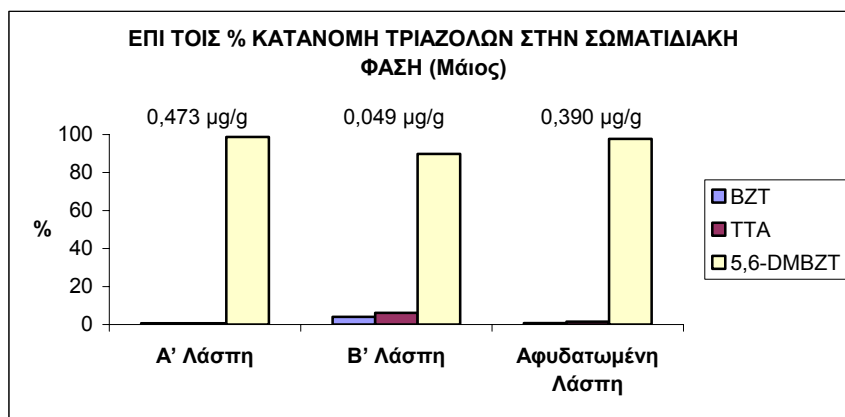


Διάγραμμα 3.9: Επί τοις % κατανομή τριαζολών σε υγρά δείγματα του Σ.Β.Ε.Λ. (1^η δειγματοληψία: Μάιος)

Όπως προκύπτει από το παραπάνω διάγραμμα η 5,6-DM-BZT υπερέχει ποσοτικά έναντι των άλλων δύο τριαζολών σε όλα τα στάδια εκτός από αυτά της εξόδου της Α' και Β' ΔΚ. Έτσι το συνολικό ποσοστό των τριαζολών καθορίζεται κυρίως από την ποσότητα αυτής της ένωσης στα παραπάνω δείγματα. Προκύπτει λοιπόν το συμπέρασμα ότι την συγκεκριμένη ημέρα τα απόβλητα που εισήλθαν στον χώρο του βιολογικού σταθμού περιείχαν μεγαλύτερη ποσότητα της 5,6-διμέθυλο-BZT.

Το τελευταίο συμπέρασμα ενισχύεται από το γεγονός ότι αν και η BZT είναι περισσότερο υδρόφιλη ένωση και εμφανίζει μεγαλύτερη διαλυτότητα στο νερό σε σχέση με τις άλλες δύο, φαίνεται να βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση στα δείγματα αυτά. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να δικαιολογηθεί από την διαφορά ποιότητας (πηγής) των λυμάτων τα οποία εισέρχονται στον χώρο του βιολογικού σταθμού και τα οποία προέρχονται από διαφορετικές πηγές και με διαφορετικές χρήσεις χημικών παρασκευασμάτων τα οποία περιέχουν τις ενώσεις αυτές. Στον ίδιο λόγο μπορεί να αποδοθεί και η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε TTA σε σχέση με την 5,6-DM-BZT, για την μέρα αυτή.

Παρατηρώντας την παρουσία των τριαζολών τόσο στην υγρή όσο και στην σωματιδιακή φάση: λάσπη Α' ΔΚ, λάσπη Β' ΔΚ, αφυδατωμένη λάσπη (Διάγραμμα 3.10), προκύπτει ότι η παρουσία των τριαζολών στα τελευταία είναι αρκετά μικρότερη από αυτήν στην υγρή φάση. Γεγονός που συμφωνεί με τον υδρόφιλο χαρακτήρα και την διαλυτότητα των ενώσεων αυτών.



Διάγραμμα 3.10: Επί τοις % κατανομή τριαζολών στην σωματιδιακή φάση λυμάτων από τον Σ.Β.Ε.Α. (1^η δειγματοληψία: Μάιος)

Επίσης η παρατηρούμενη αναλογία: 5,6-διμέθυλο-BZT > TTA > BZT των ενώσεων αυτών στην σωματιδιακή φάση συμφωνεί με την άποψη ότι όσο περισσότερο λιπόφιλη είναι μία ένωση τόσο πιο έντονη είναι η παρουσία της στην σωματιδιακή φάση. Στο σημείο βέβαια αυτό, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η παραπάνω κατανομή είναι συνάρτηση και της συγκέντρωσης των ενώσεων αυτών για την δεδομένη χρονική περίοδο.

Συνολικά η παρουσία τριαζολών στα παραπάνω δείγματα είναι ιδιαίτερα έντονη στο δείγμα της εισόδου της Β' ΔΚ. Έντονη είναι η μείωση των ενώσεων αυτών στο αμέσως επόμενο στάδιο το οποίο είναι η έξοδος της Β' ΔΚ. Το τελευταίο μπορεί να αποδοθεί στην χρήση χλωρίου στο ενδιάμεσο των δύο αυτών σταδίων, το οποίο χρησιμοποιείται για απολύμανση. Το χλώριο όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό τμήμα έχει την ικανότητα να καταστρέφει το στρώμα των τριαζολών πάνω σε μεταλλικές επιφάνειες, υπάρχει λοιπόν συσχέτιση μεταξύ των τριαζολών και της παρουσίας χλωρίου στο ίδιο περιβάλλον.

Αν εξαιρεθεί το δείγμα της εισόδου της Β' ΔΚ, στα υπόλοιπα στάδια επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων παρατηρείται μία πτωτική τάση της συγκέντρωσης των τριαζολών κατά την επεξεργασία των λυμάτων στον βιολογικό σταθμό. Περισσότερο έντονη είναι η μείωση η οποία παρατηρείται στην TTA, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να δικαιολογηθεί αν λάβουμε υπόψη μας τον μικρότερο χρόνο φωτοδιάσπασης της σε σχέση με την BZT (Βλ. Πίνακα 1.7). Η προαναφερθείσα εξαίρεση για το δείγμα της εισόδου της Β' ΔΚ, όπου παρατηρείται απότομη αύξηση της ποσότητας των τριαζολών, αποτελεί παράδοξο γεγονός και ίσως θα μπορούσε να αποδοθεί στον διαφορετικό χρόνο παραμονής των λυμάτων σε κάθε στάδιο επεξεργασίας.

3.4.2. 2^η-Δειγματοληψία

3.4.2.1. Υγρή φάση

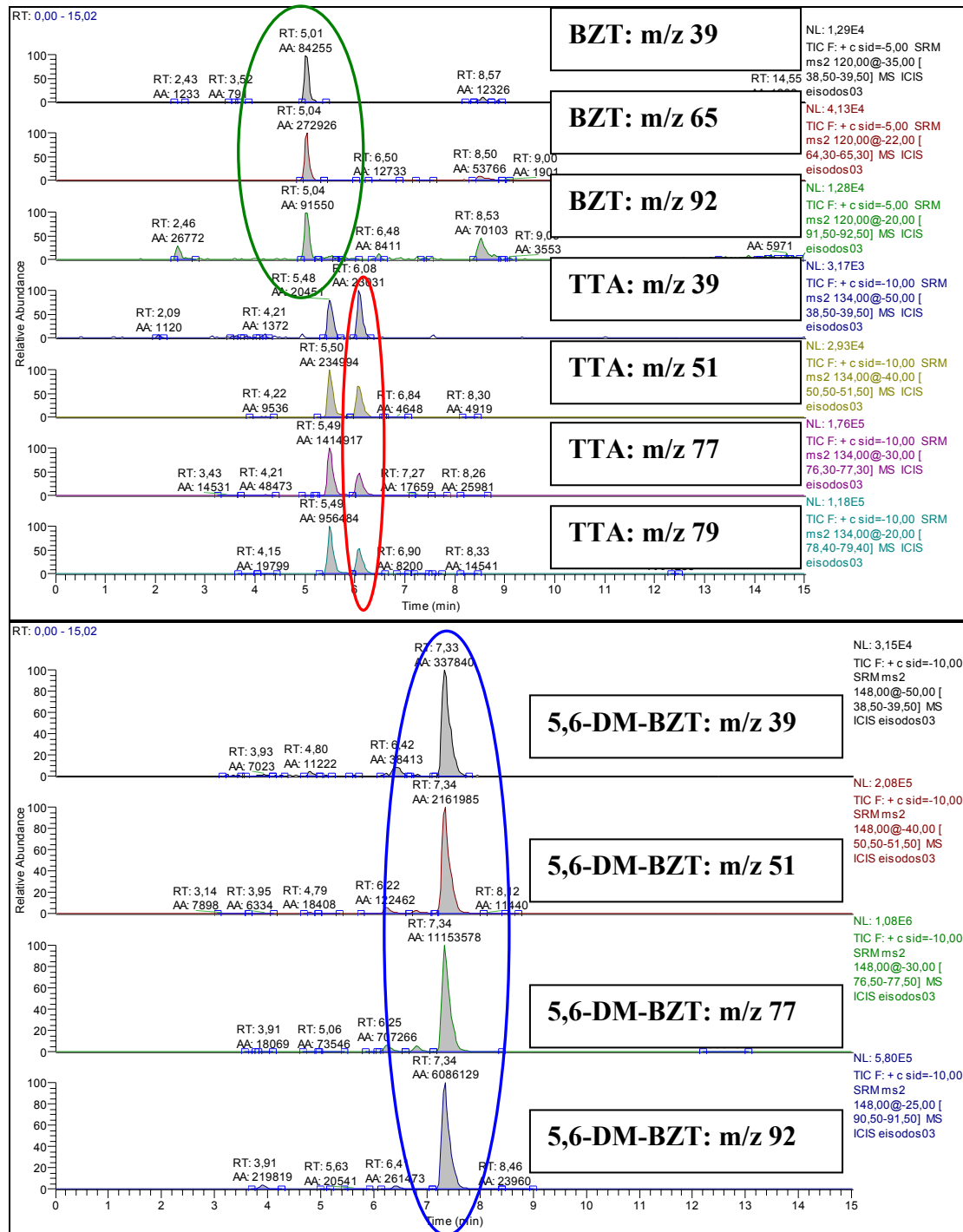
Ο ποσοτικός προσδιορισμός των τριαζολών για τα υγρά απόβλητα (δειγματοληψία: 04/11/05) γίνεται με την μέθοδο προσθήκης γνωστών ποσοτήτων (standard addition method) κι αυτό γιατί, μετά από μελέτη η οποία διεξήχθη, όπως αναλύεται στο Κεφ. 3.3, παρατηρείται ότι τα δείγματα αυτά παρουσιάζουν παρεμπόδιση μήτρας. Για του λόγου το αληθές, παρατίθεται ο Πίνακας 3.19 ο οποίος προκύπτει μετά από μελέτη (και υπολογισμό του ολοκληρώματος των αντίστοιχων κορυφών) για την παρουσία ή όχι παρεμπόδισης μήτρας σε ένα υδατικό δείγμα - απόβλητο από το στάδιο της Εισόδου.

Στον Πίνακα 3.19 αυτό παρατηρείται ότι η επί τοις % διαφορά των κλίσεων, της ευθείας που προκύπτει για την καμπύλη αναφοράς και της ευθείας που προκύπτει από την προσθήκη σταθερής ποσότητας, είναι μεγαλύτερη από το 10% το οποίο ορίζεται σαν όριο κάτω του οποίου το δείγμα δεν εμφανίζει παρεμπόδιση. Επίσης υπάρχει σημαντική διαφορά της συγκέντρωσης των θραυσμάτων όπως υπολογίζεται από την καμπύλη αναφοράς και από την καμπύλη προσθήκης γνωστής ποσότητας. Οι δύο παραπάνω λόγοι οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η παρεμπόδιση σε αυτά τα δείγματα είναι υπαρκτή και συνεπώς ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με χρήση της μεθόδου προσθήκης γνωστής ποσότητας.

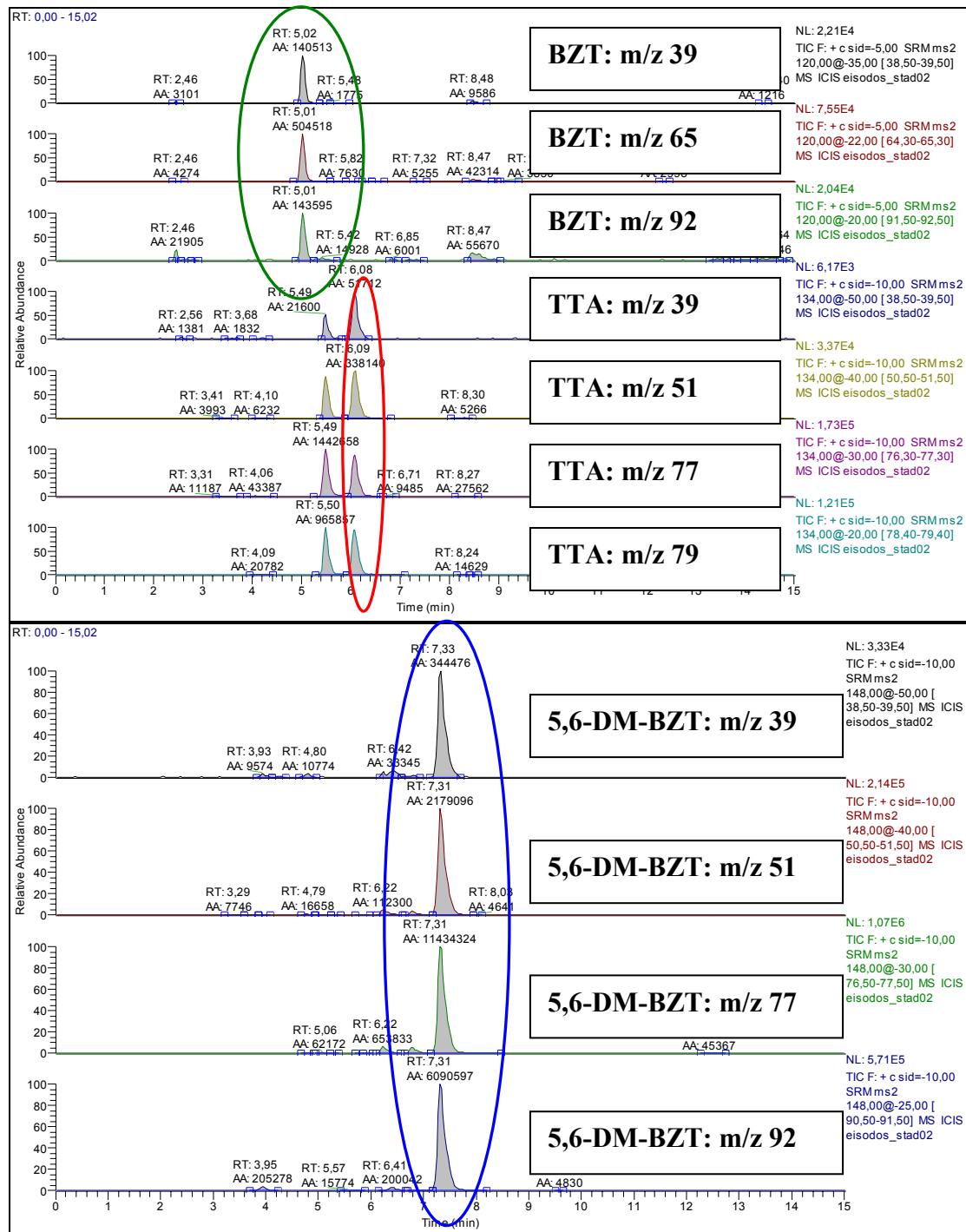
Πίνακας 3.19: Έλεγχος ύπαρξης παρεμπόδισης μήτρας και ποσοτικός προσδιορισμός των τριαζολών σε υγρό δείγμα Εισόδου από τον Σταθμό Βιολογικής Επεξεργασίας Λυμάτων (Σ.Β.Ε.Λ.)

	C (ppb)	ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ										
		<i>Βενζοτριαζόλη (ολοκλήρωμα)</i>			<i>Τολοτριαζόλη (ολοκλήρωμα)</i>				<i>5,6-διμέθιλο-βενζοτριαζόλη (ολοκλήρωμα)</i>			
		Θραύσμα 1 (39)	Θραύσμα 2 (65)	Θραύσμα 3 (92)	Θραύσμα 4 (39)	Θραύσμα 5 (51)	Θραύσμα 6 (77)	Θραύσμα 7 (79)	Θραύσμα 8 (39)	Θραύσμα 9 (51)	Θραύσμα 10 (77)	Θραύσμα 11 (91)
Τυφλό (water+MeOH)	0	31,58	42,26	0	71,19	46,7	60,88	317	9,9	95,08	2286	0
Συγκέντρωση 1	20	66226	226592	77640	24719	185168	830101	620883	28363	169487	882288	464951
Συγκέντρωση 2	40	132620	450275	144581	55096	363489	1584209	1129261	44541	307663	1682159	917812
Συγκέντρωση 3	80	285005	887180	302961	99469	734844	4237975	2399746	99648	653878	3376232	1797014
Συγκέντρωση 4	160	543990	1827047	584644	198440	1421039	6091795	4754365	183706	1183129	6236304	3254529
Δείγμα χωρίς προσθήκη	0	68614	279877	100746	22017	186395	768375	628079	328172	2068299	10628224	5695709
Σταθερή προσθήκη 1	20	112458	379143	120723	30545	253773	1037106	843502	329892	2096342	10909506	5953468
Σταθερή προσθήκη 2	40	140513	504518	143595	51712	338140	1458389	1145786	344476	2179096	11434324	6090597
Σταθερή προσθήκη 3	80	198136	695261	229103	80567	479243	2134329	1633176	352884	2371975	12328470	6646383
Σταθερή προσθήκη 4	160	359745	1205845	378147	123760	849579	3536076	2707907	420883	2627338	13921689	7482431
Συγκέντρωση από σταθερή προσθήκη ΑΡΑΙΩΣΗ(322-->350)=1,087		38,706	46,087	48,596	34,861	41,479	42,275	46,482	546,610	545,703	476,213	534,902
		42,073	50,097	52,824	37,894	45,088	45,953	50,525	594,165	593,179	517,644	581,439
Συγκέντρωση από καμπύλη αναφοράς		21,752	27,188	29,257	18,151	21,914	16,414	24,443	309,079	301,161	294,492	301,870
Κλίση 1 (σταθ. προσθ)		1782	5777,6	1790,7	650,64	4152,8	17471	13070	585,65	3665	20999	11217
Κλίση 2 (καμπ. αναφορ.) (Κλίση 2 - Κλίση 1)		3424,7	11399	3657,9	1233,7	8882,6	39315	30175	1146,1	7403,3	38880	20277
(Κλίση 2 - Κλίση1)*100%		1642,7	5621,4	1867,2	583,06	4729,8	21844	17105	560,45	3738,3	17881	9060
		48,0	49,3	51,0	47,3	53,2	55,6	56,7	48,9	50,5	46,0	44,7

Ακολουθώς παρατίθενται δύο αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα τα οποία προκύπτουν από το δείγμα της εισόδου (χωρίς προσθήκη) και μετά από προσθήκη 40 ppb μίγματος των τριών ενώσεων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η προσθήκη γνωστής ποσότητας γίνεται για διάφορες συγκεντρώσεις των οποίων τα χρωματογραφήματα παρουσιάζουν διαφορές μόνο ως προς την ένταση του σήματος και θα ήταν πλεονασμός να παρουσιαστούν όλα.



Χρωματογράφημα 3.10: Είσοδος (18/11/2005)



Χρωματογράφημα 3.11: Είσοδος - Προσθήκη σταθερής ποσότητας: 40ppb (18/11/2005)

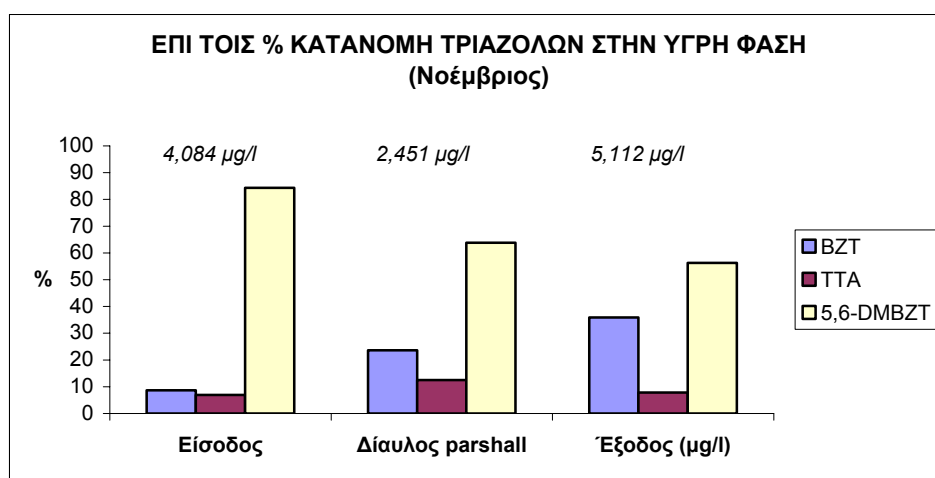
Ανάλογη είναι η επεξεργασία των δεδομένων που προκύπτουν κατά την ανάλυση και των υπολοίπων δειγμάτων (υγρά απόβλητα) στο σύστημα HPLC-ES-MS/MS. Κάποια αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα και πίνακες παρατίθενται στο Παράρτημα 1 και στο Παράρτημα 2 αντίστοιχα.

Λαμβάνοντας υπόψη την ύπαρξη της παρεμπόδισης μήτρας τα αποτελέσματα που λαμβάνονται κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των τριαζολών σε υγρά απόβλητα, από διάφορα στάδια επεξεργασίας του βιολογικού σταθμού, προκύπτουν τα αποτελέσματα που αναγράφονται στον Πίνακα 3.20.

Πίνακας 3.20: Ποσοτικός προσδιορισμός της ΒΖΤ, της ΤΤΑ και της 5,6-DM-BΖΤ σε δείγματα υγρών αποβλήτων

Υγρή φάση	ΒΖΤ (n=3)	ΤΤΑ (n=3)	5,6-DM-BΖΤ (n=3)
Είσοδος (µg/l)	0,355 ± 0,003	0,285 ± 0,004	3,445 ± 0,024
Διαυλος Parshall (µg/l)	0,579 ± 0,094	0,307 ± 0,006	1,565 ± 0,006
Είσοδος Β' δεξαμενής (µg/l)	1,835 ± 0,014	0,400 ± 0,006	2,878 ± 0,009

Η γραφική αναπαράσταση της επί τοις εκατό κατανομής των τριαζολών στην υγρή φάση των παραπάνω σταδίων επεξεργασίας λυμάτων, καθώς και η συνολική ποσότητα τους παριστάνονται στο διάγραμμα 3.11.



Διάγραμμα 3.11: Επί τοις % κατανομή τριαζολών σε υγρά δείγματα του Σ.Β.Ε.Λ. (2^η δειγματοληψία: Νοέμβριος)

Όπως παρατηρείται στο παραπάνω διάγραμμα η κατανομή των τριών τριαζολών ακολουθεί, και στα τρία υπό μελέτη δείγματα, μία ομοιομορφία. Πιο συγκεκριμένα, η ποσότητα των τριαζολών αυτών ακολουθεί την εξής σειρά:

5,6-διμέθυλο-βενζοτριαζόλη > βενζοτριαζόλη > τολουλτριαζόλη

Η σειρά αυτή ισχύει τόσο για την υγρή όσο και για την σωματιδιακή φάση. Το αναμενόμενο θα ήταν η τολυλτριαζόλη να υπερिσχύει της βενζοτριαζόλης ποσοτικά στην σωματιδιακή φάση. Όμως όπως προαναφέρθηκε, για την πρώτη δειγματοληψία, η κατανομή των τριαζολών εξαρτάται και από την συγκέντρωση τους, γεγονός που επηρεάζεται από την διαφορετική περιεκτικότητα των λυμάτων σε τριαζόλες.

3.4.2.2. Σωματιδιακή φάση

Εξαιτίας του υδρόφιλου χαρακτήρα και της διαλυτότητας των τριαζολών στο νερό, η παρουσία τους στην σωματιδιακή φάση αναμένεται μικρή. Έτσι ο ποσοτικός προσδιορισμός στα δείγματα αυτά γίνεται με χρήση εξωτερικής καμπύλης βαθμονόμησης. Τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν και αφορούν στον ποσοτικό προσδιορισμό των τριαζολών στην σωματιδιακή φάση αναγράφονται στον Πίνακα 3.21.⁴

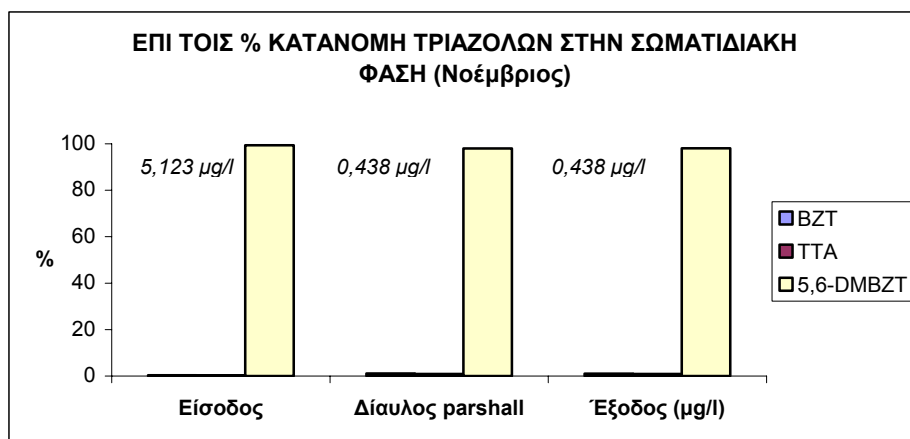
Πίνακας 3.21: Ποσοτικός προσδιορισμός της BZT, της TTA και της 5,6-DM-BZT στην σωματιδιακή φάση

<i>Σωματιδιακή φάση</i>	BZT	TTA	5,6-DMBZT
Είσοδος (μg/l)	0,017	0,015	5,092
Διάλυλος parshall (μg/l)	0,005	0,004	0,430
Έξοδος (μg/l)	0,004	0,004	0,430

Μια πολύ σημαντική παρατήρηση που αφορά την κατανομή των τριαζολών ανάμεσα στην υγρή και στην σωματιδιακή φάση είναι ότι αυτή στην υγρή είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από αυτήν στην σωματιδιακή φάση. Αυτό είναι αναμενόμενο, εάν λάβουμε υπόψη μας την υψηλή διαλυτότητα και τον υδρόφιλο χαρακτήρα των ενώσεων αυτών. Εμφανίζεται όμως και μία εξαίρεση για το δείγμα της εισόδου, όπου η 5,6-διμέθυλο-βενζοτριαζόλη

⁴ Η συγκέντρωση των τριαζολών στην σωματιδιακή φάση στον πίνακα αυτή έχει αναχθεί σε μg/l, σε αντίθεση με τον πίνακα 3.26 όπου η ποσότητα τους έχει εκφραστεί σε μg/g, αυτό έγινε λαμβάνοντας υπόψη τον όγκο του διαλύματος απ' όπου πέρχεται η σωματιδιακή φάση. Σκοπός αυτής της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων είναι η δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων μεταξύ της υγρής και σωματιδιακής φάσης.

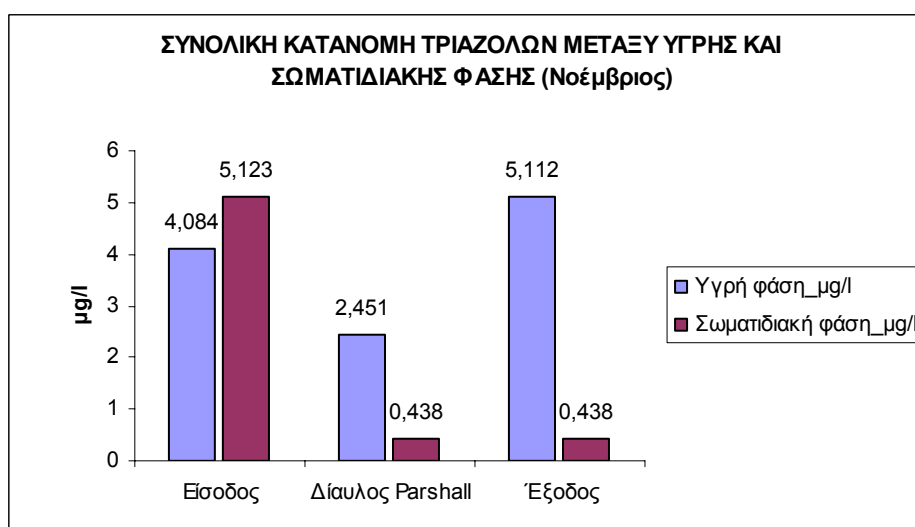
παρουσιάζει αρκετά μεγαλύτερη συγκέντρωση στην σωματιδιακή απ' ότι στην υγρή φάση. Εάν παρατηρηθεί η επί τοις εκατό κατανομή των τριαζολών στην σωματιδιακή φάση (Διάγραμμα 3.12), γίνεται φανερή η υψηλή περιεκτικότητα σε 5,6-DM-BZT σε όλα τα στάδια.



Διάγραμμα 3.12: Επί τοις % κατανομή τριαζολών στην σωματιδιακή φάση λυμάτων από τον Σ.Β.Ε.Λ. (2^η δειγματοληψία: Νοέμβριος)

Η υψηλή συγκέντρωση της ένωσης αυτής στην σωματιδιακή φάση σε σχέση με τις άλλες δύο δικαιολογείται από τον λιπόφιλο χαρακτήρα της.

Η συνολική κατανομή των τριαζολών, ανάμεσα στην υγρή και στην σωματιδιακή φάση, παριστάνεται γραφικά ακολούθως:



Διάγραμμα 3.13: Συνολική κατανομή τριαζολών σε υγρή και σωματιδιακή φάση (Νοέμβριος '05)

Όπως προκύπτει από το διάγραμμα αυτό η κατανομή των τριαζολών είναι μεγαλύτερη στην υγρή φάση για τα στάδια επεξεργασίας του διαύλου parshall και της εξόδου. Η κατανομή αυτή μεταξύ της υγρή και σωματιδιακής φάσης συμφωνεί με την υδροφιλικότητα και την διαλυτότητα στο νερό των ενώσεων αυτών στο νερό.

Εξαιρέση αποτελεί το δείγμα της εισόδου όπου η συνολική συγκέντρωση των τριαζολών είναι μεγαλύτερη για την σωματιδιακή φάση. Αυτό όμως δεν έρχεται σε αντίθεση με όσα προαναφέρθηκαν, γιατί η κατανομή αυτή επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την υψηλή συγκέντρωση της 5,6-BZT συνολικά στο δείγμα της εισόδου, γεγονός που επηρεάζει και την συνολική κατανομή των τριαζολών μεταξύ των δύο φάσεων. Άλλωστε το η κατανομή των τριαζολών ανάμεσα στις δύο φάσεις εξαρτάται κι από τον χρόνο παραμονής τους στις διάφορες δεξαμενές επεξεργασίας, μιας και το φαινόμενο προσρόφησης εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως αναφέρθηκε στο Κεφ. 1.8. Θέλοντας να μελετήσουμε με μεγαλύτερη ακρίβεια το φαινόμενο της προσρόφησης των τριαζολών στην σωματιδιακή φάση, έγινε υπολογισμός του συντελεστή προσρόφησης K_d , όπως περιγράφεται και αναλύεται διεξοδικά στο Κεφ. 3.5.

3.4.3. 3^η-Δειγματοληψία

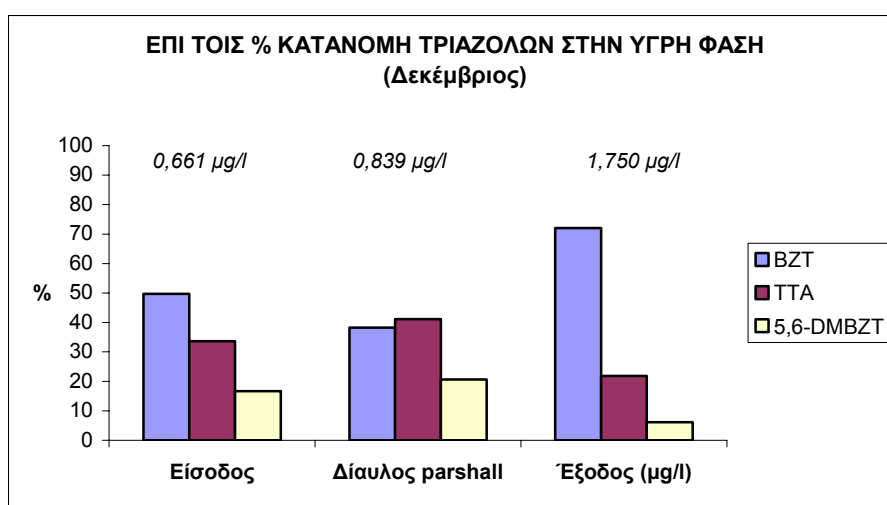
3.4.3.1.. Υγρή φάση

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των τριαζολών για τα υγρά απόβλητα (δειγματοληψία: 07/12/05) γίνεται με την μέθοδο προσθήκης γνωστής ποσότητας ώστε να αποφευχθεί η επίδραση παρεμπόδισης μήτρας. Ακολουθείται η ίδια μεθοδολογία η οποία περιγράφηκε και εφαρμόστηκε κατά την 2^η δειγματοληψία. Τα αποτελέσματα τα οποία προκύπτουν παρατίθενται στον Πίνακα 3.22.

Πίνακας 3.22: Ποσοτικός προσδιορισμός της ΒΖΤ, της ΤΤΑ και της 5,6-DM-BΖΤ σε δείγματα υγρών αποβλήτων

Υγρή φάση	ΒΖΤ (n=3)	ΤΤΑ (n=3)	5,6-DM-BΖΤ (n=3)
Είσοδος (μg/l)	0,328 ± 0,012	0,222 ± 0,028	0,110 ± 0,013
Διάλυλος Parshall (μg/l)	0,320 ± 0,020	0,345 ± 0,014	0,173 ± 0,005
Είσοδος Β' δεξαμενής (μg/l)	1,261 ± 0,462	0,382 ± 0,055	0,107 ± 0,006

Ενώ η επί τοις εκατό κατανομή τους στην υγρή φάση παριστάνεται στο διάγραμμα 3.14.



Διάγραμμα 3.14: Επί τοις % κατανομή τριαζολών σε υγρά δείγματα του Σ.Β.Ε.Λ. (3^η δειγματοληψία: Δεκέμβριος)

Όπως προκύπτει από το διάγραμμα αυτό η ποσότητα των τριαζολών για την υγρή φάση ακολουθεί την εξής σειρά:

Βενζοτρίαζόλη > Τολουλτριαζόλη > 5,6-διμέθυλο-βενζοτρίαζόλη

Τα παραπάνω δεδομένα συμφωνούν με τον περισσότερο ή λιγότερο λιπόφιλο χαρακτήρα των ενώσεων αυτών, ο οποίος περιγράφηκε στην ανάλυση των προηγούμενων δειγματοληψιών. Λαμβάνοντας όμως υπόψη και την ισχυρά υδρόφιλη φύση των ενώσεων αυτών, θα αναμενόταν για όλα τα στάδια της επεξεργασίας να υπάρχει μεγαλύτερη συγκέντρωση των ενώσεων στην υγρή απ' ότι την σωματιδιακή φάση. Αυτό συμβαίνει με την ΒΖΤ και την ΤΤΑ, ενώ

εξαιρέση αποτελεί η 5,6-BZT, η οποία εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στη σωματιδιακή φάση βλ. Πίνακας 3.24.

3.4.3.2. Σωματιδιακή φάση

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των τριαζολών για στην σωματιδιακή φάση (δειγματοληψία: 07/12/05) γίνεται με χρήση καμπύλης βαθμονόμησης. Τα αποτελέσματα τα οποία προκύπτουν παρατίθενται στον Πίνακα 3.23.

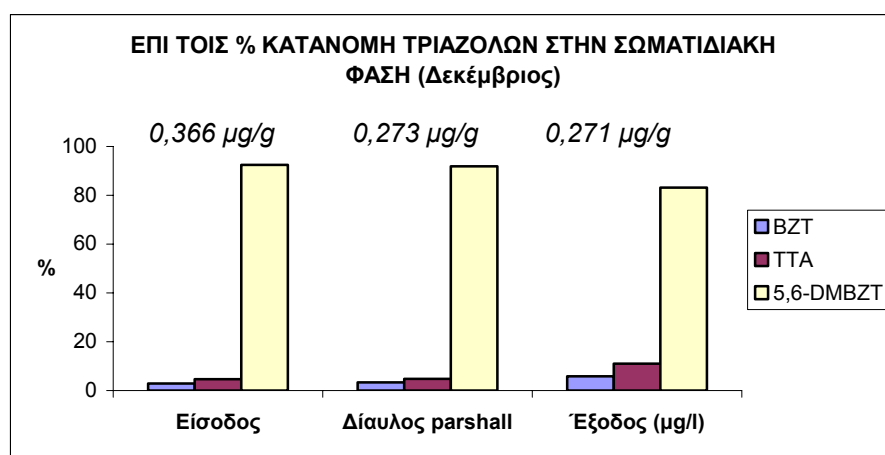
Πίνακας 3.23: Ποσοτικός προσδιορισμός της BZT, της TTA και της 5,6-DM-BZT στην σωματιδιακή φάση

Σωματιδιακή φάση	BZT	TTA	5,6-DMBZT
Είσοδος (µg/l)	0,011	0,017	0,338
Διάλυλος parshall (µg/l)	0,009	0,013	0,251
Έξοδος (µg/l)	0,016	0,030	0,226

Παρατηρείται ότι για την σωματιδιακή φάση η σειρά κατανομής των τριαζολών είναι η εξής:

5,6-διμέθυλο-βενζοτρίαζόλη > Τολουτρίαζόλη > Βενζοτρίαζόλη

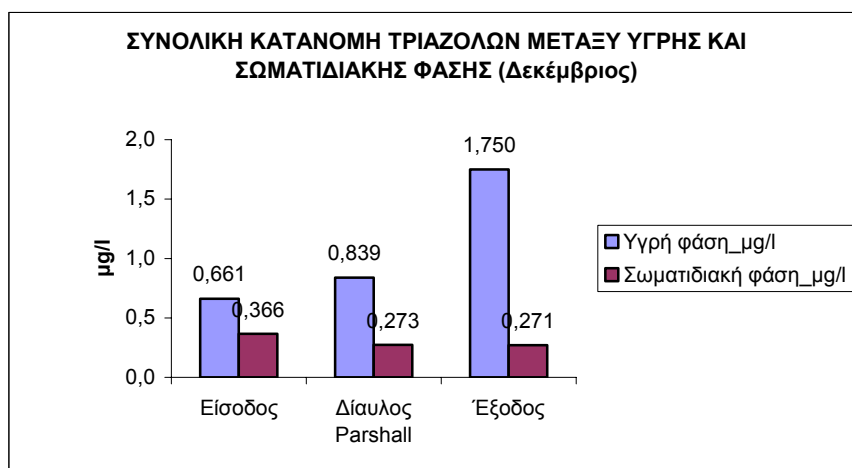
Ενώ η επί τοις εκατό αναπαράσταση της κατανομής των τριαζολών στα διάφορα στάδια επεξεργασίας λυμάτων του Σ.Β.Ε.Λ. φαίνεται στο διάγραμμα 3.15.



Διάγραμμα 3.15: Επί τοις % κατανομή τριαζολών στην σωματιδιακή φάση λυμάτων από τον Σ.Β.Ε.Λ. (3^η δειγματοληψία: Δεκέμβριος)

Είναι εμφανής η αυξημένη συγκέντρωση της 5,6-DM-BZT στην σωματιδιακή φάση, λόγω του λιπόφιλου χαρακτήρα της ένωσης αυτής. Όπως διεξοδικά αναλύεται στο Κεφ. 3.5 η προσρόφηση μίας ένωσης στην σωματιδιακή φάση εξαρτάται κι από τον ίδιο τον προσροφητή, συνεπώς η αυξημένη προσρόφηση της 5,6-BZT στην σωματιδιακή φάση θα μπορούσε να αποδοθεί στην υψηλή συγγένεια μεταξύ αυτής της ένωσης και του προσροφητικού υποστρώματος για τα δεδομένα δείγματα.

Γενικότερα, η συνολική κατανομή των τριαζολών μεταξύ της υγρής και της σωματιδιακής φάσης παριστάνεται στο ακόλουθο διάγραμμα.



Διάγραμμα 3.16: Συνολική κατανομή τριαζολών σε υγρή και σωματιδιακή φάση (Δεκέμβριος '05)

Από το διάγραμμα αυτό προκύπτει ότι η συνολική κατανομή των τριαζολών, για την δειγματοληψία του Δεκεμβρίου, είναι μεγαλύτερη στην υγρή απ' ότι στην σωματιδιακή φάση. Θέλοντας να μελετήσουμε το φαινόμενο της προσρόφησης το οποίο έχει λάβει χώρα στην συγκεκριμένη δειγματοληψία, υπολογίστηκαν οι συντελεστές προσρόφησης K_d , από τα πειραματικά δεδομένα. Οι τιμές που προέκυψαν αναφέρονται στην παράγραφο 3.5.3.

3.4.4. Εμπορικά προϊόντα

Ο ποσοτικός προσδιορισμός στα δείγματα αυτά γίνεται με χρήση εξωτερικής καμπύλης βαθμονόμησης. Τα αποτελέσματα τα οποία προκύπτουν παρατίθενται στον Πίνακα 3.24.

Πίνακας 3.24: Ποσοτικός προσδιορισμός της ΒΖΤ, της ΤΤΑ και της 5,6-DM-BΖΤ σε εμπορικά προϊόντα

	BΖΤ	ΤΤΑ	5,6-DM-BΖΤ
	Συγκέντρωση/ Ποσότητα (n=3)	Συγκέντρωση/ Ποσότητα (n=3)	Συγκέντρωση/ Ποσότητα (n=3)
Αντιψυκτικό (μg/l)	Δ. Α.	935,8 ± 7,1	7,0 ± 0,6
Calgonit (μg/g)	59,7 ± 1,1	Δ. Α.	Δ. Α.
Skip (μg/l)	Δ. Α.	Δ. Α.	Δ. Α.

Δ.Α.: Δεν ανιχνεύτηκε

Οι ιδιότητες των υπό μελέτη ενώσεων (όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό τμήμα) τις καθιστά χρήσιμα πρόσθετα στα παραπάνω εμπορικά προϊόντα. Αυτό κυρίως οφείλεται στην ιδιότητα τους να προστατεύουν μεταλλικές επιφάνειες από την οξείδωση παρουσία υδάτινου περιβάλλοντος. Η μελέτη λοιπόν των εμπορικών αυτών προϊόντων απέδειξε όντως την χρήση των ενώσεων σε αυτά με εξαίρεση το skip όπου δεν ανιχνεύτηκε η παρουσία καμιάς από τις τρεις βενζοτρίαζόλες. Το αντιψυκτικό υγρό αυτοκινήτων φαίνεται να περιέχει τις ΤΤΑ και 5,6-DM-BΖΤ, ενώ το απορρυπαντικό πλυντηρίου πιάτων περιέχει την ΒΖΤ σε ποσότητες οι οποίες αναφέρονται στον Πίνακα 3.24.

3.5. Συσχέτιση των συγκεντρώσεων στη σωματιδιακή και διαλυτή φάση με χρήση ισόθερμων προσρόφησης.

3.5.1. Ισόθερμα και ισορροπία

Στην παράγραφο αυτή επιχειρείται η σύνδεση μεταξύ των πειραματικών τιμών των προσροφημένων και διαλυμένων ποσοτήτων των τριαζολών μέσω ισόθερμων.

Όπως είναι γνωστό τα ισόθερμα είναι μοντέλα που περιγράφουν την κατανομή μιας ουσίας στις δύο φάσεις του συστήματος σε κατάσταση ισορροπίας υπό σταθερή θερμοκρασία. Λαμβάνοντας υπόψη ότι για να φτάσουν τα οικιακά απόβλητα στην εγκατάσταση του βιολογικού καθαρισμού του Ηρακλείου απαιτούνται έως και 4 ώρες, μπορεί να θεωρηθεί ότι πρακτικά στα υδατικά απόβλητα που έχουν εισέλθει στη μονάδα επικρατεί ισορροπία (steady state). Η θερμοκρασία δε των αποβλήτων εντός του δικτύου αποχέτευσης δεν παρουσιάζει αξιοσημείωτες μεταβολές. Έτσι ο συνδυασμός αυτός μεταξύ ισορροπίας και σταθερότητας της θερμοκρασίας των λυμάτων (σε όλη την έκταση της εγκατάστασης) καθιστά εφικτή την εφαρμογή των μαθηματικών εκφράσεων των ισόθερμων προκειμένου να γίνει συσχέτιση των ενώσεων μας μεταξύ σωματιδιακής και διαλυτής φάσης.

Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη όσα αναφέρονται για τις ισόθερμες προσρόφησης στο τμήμα 1.8.2, καταλήγουμε τελικά στην εφαρμογή του γραμμικού μοντέλου στα αιωρούμενα στερεά για τις δύο προαναφερθείσες δειγματοληψίες. Αυτό συμβαίνει γιατί η συγκέντρωση των τριαζολών στο διάλυμα είναι μικρή κι επομένως ευνοείται η χρήση του γραμμικού μοντέλου σε σχέση με το μοντέλο Freundlich.

Υπενθυμίζεται ότι οι σχέσεις (1.1) και (1.2), που αναφέρονται στα δύο αυτά μοντέλα είναι οι εξής:

$$C_s = K_D C_w$$

$$C_s = K_F C_w^{1/n}$$

όπου

- Cs: προσροφημένη ποσότητα, μάζα ανά μονάδα μάζας προσροφητικού υλικού εκφρασμένη σε (mg/kg)
- Cw: διαλυτή ποσότητα, μάζα ανά μονάδα όγκου διαλύματος εκφρασμένη σε (mg/l)
- KF: είναι ο συντελεστής Freundlich και εκφράζει το μέγεθος προσρόφησης, και
- n: συντελεστής έντασης της ρόφησης.

3.5.2. «Δείκτης προσρόφησης» και επίδραση της συγκέντρωσης των σωματιδίων

Στον Πίνακα 3.25, με την βοήθεια των συγκεντρώσεων στα δείγματα ροής, υπολογίζεται ο συντελεστής K με τρόπο όμοιο του συντελεστή κατανομής K_d του γραμμικού ισοθέριμου. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι ο συντελεστής K στον πίνακα αυτό αποτελεί απλώς ένα «δείκτη προσρόφησης» σε κάθε στάδιο επεξεργασίας. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν μετά από την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων, και τα οποία αναγράφονται ακολούθως, προκύπτουν οι εξής τιμές για το K:

Πίνακας 3.25: Προσδιορισμός του «δείκτη προσρόφησης» K από πειραματικά δεδομένα (Νοέμβριος)

Νοέμβριος		Διαλυμένα μg/l	Προσροφημένα μg/g	K_d l/kg	log k_d
Είσοδος	BZT	0,355	0,006	16	1,196
	TTA	0,285	0,005	17	1,224
	5,6-DM-BZT	3,445	1,669	485	2,685
Δίαυλος Parshall	BZT	0,579	0,012	21	1,312
	TTA	0,307	0,010	31	1,496
	5,6-DM-BZT	1,565	1,043	667	2,824
Έξοδος	BZT	1,835	0,020	11	1,046
	TTA	0,400	0,019	47	1,671
	5,6-DM-BZT	2,878	1,997	694	2,841

Όπως παρατηρείται οι συντελεστές προσρόφησης που προέκυψαν από τα πειραματικά δεδομένα είναι σαφώς μεγαλύτεροι για την διπλά

υποκατεστημένη βενζοτριαζόλη (5,6-BZT), ενώ ακολουθεί η τολυλτριαζόλη και τελευταία η βενζοτριαζόλη. Αυτό συμφωνεί με τον λιπόφιλο χαρακτήρα των ενώσεων αυτών, ο οποίος εξ' αιτίας της παρουσίας η απουσίας μεθυλιών σε αυτές μεταβάλλεται και παράλληλα μεταβάλλει και την προσρόφηση τους. Πιο αναλυτικά, η παρουσία δύο μεθυλιών στον βενζολικό δακτύλιο της 5,6-BZT την κάνει περισσότερο υδρόφοβη σε σχέση με την TTA η οποία διαθέτει ένα μόνο μεθύλιο πάνω στον δακτύλιο, ενώ λιγότερο υδρόφοβη είναι η BZT η οποία δεν διαθέτει κανένα μεθύλιο (βλ. δομές ενώσεων Κεφ.1).

Οι ίδιες παρατηρήσεις ισχύουν και για την δειγματοληψία του μήνα Δεκεμβρίου. Τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν αναγράφονται στον Πίνακα 3.26:

Πίνακας 3.26: Προσδιορισμός του «δείκτη προσρόφησης» K από πειραματικά δεδομένα (Δεκέμβριος)

Δεκέμβριος		Διαλυμένα μg/l	Προσροφημένα μg/g	Kd l/kg	log kd
Είσοδος	BZT	0,328	0,002	6	0,765
	TTA	0,222	0,003	14	1,144
	5,6-DM-BZT	0,110	0,061	558	2,746
Διαυλος Parshall	BZT	0,320	0,002	7	0,829
	TTA	0,345	0,003	9	0,953
	5,6-DM-BZT	0,173	0,059	344	2,536
Έξοδος	BZT	1,261	0,037	29	1,469
	TTA	0,382	0,070	183	2,263
	5,6-DM-BZT	0,107	0,530	4957	3,695

Η μεγάλη διαφορά του συντελεστή προσρόφησης της 5,6-διμέθυλο-BZT σε σχέση με τις άλλες δύο βενζοτριαζόλες δικαιολογεί και την αυξημένη παρουσία της ένωσης αυτής στη σωματιδιακή φάση.

Θέλοντας να συγκρίνουμε την μέση τιμή για τα $\log k_d$ έτσι όπως προέκυψαν από τα πειραματικά δεδομένα με τις αντίστοιχες τιμές των δεικτών λιποφιλίας $\log k_{ow}$ (βλ. Κεφ. 1.9) και του $\log k_{oc}$, προκύπτει ο Πίνακας 3.27.

Πίνακας 3.27: Μέση τιμή/Τυπική απόκλιση (n=5) του δείκτη προσρόφησης Kd από πειραματικά δεδομένα και του δείκτη Koc

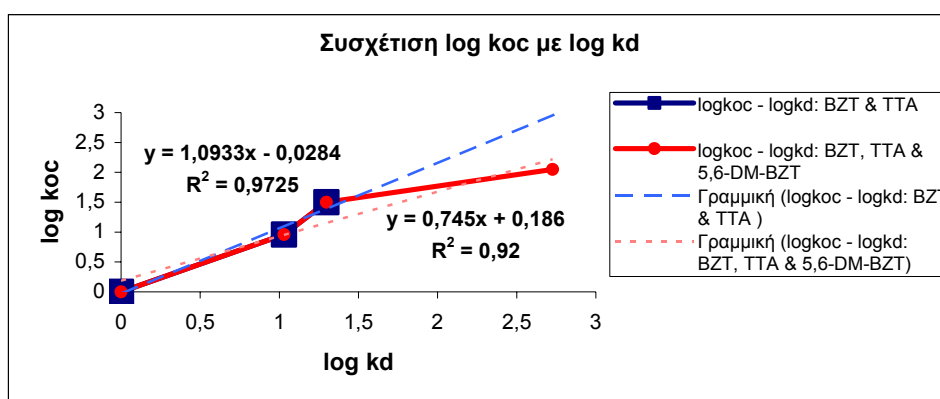
	log k _{ow}	log k _{oc}	log k _d
BZT	1,17	0,96	1,03 ± 0,234
ΤΤΑ	1,71	1,5	1,298 ± 0,286
5,6-DM-BZT	2,26	2,05	2,727 ± 0,123

Οι τιμές του logk_{oc} προκύπτουν με αντικατάσταση του logk_{ow} στην μαθηματική σχέση:

$$\log k_{oc} = \log k_{ow} - 0,21 \quad (5.1)$$

η οποία ισχύει για δύο κατηγορίες ενώσεων: τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες και τους χλωριωμένους υδρογονάνθρακες [52].

Θέλοντας να συσχετίσουμε τα πειραματικά αποτελέσματα με τις προαναφερθείσες θεωρητικές τιμές προκύπτει το διάγραμμα 3.17.



Διάγραμμα 3.17: Συσχέτιση δείκτη προσρόφησης Kd και δείκτη λιποφιλίας Kow

Από την γραφική αυτή αναπαράσταση των δεδομένων προκύπτει ότι υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση ($R^2=0,92$) μεταξύ των πειραματικών και θεωρητικών δεδομένων τα οποία αφορούν όλες τις ενώσεις. Συνεπώς τα πειραματικά αποτελέσματα για την κατανομή των βενζοτρίαζολών μεταξύ των δύο φάσεων (υγρής και σωματιδιακής) συμφωνούν με τις θεωρητικές τιμές των σταθερών κατανομής, σε μεγάλο βαθμό. Λαμβάνοντας υπόψη την συσχέτιση μεταξύ θεωρητικών και πειραματικών τιμών μόνο για την BZT και TTA προκύπτει συσχέτιση με $R^2=0,97$, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχει

καλύτερη συσχέτιση των τιμών για τις ενώσεις αυτές απ' ότι για την 5,6-DM-BZT.

Το γεγονός ότι υπάρχει μια διαφορά μεταξύ των $\log k_d$ και $\log k_{ow}$ δικαιολογείται εάν λάβουμε υπόψη μας ότι δεν είναι μόνο η υδροφοβικότητα των ενώσεων εκείνη που καθορίζει την προσρόφηση τους στην σωματιδιακή φάση αλλά και το γεγονός ότι οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν και ιδιότητες στιγμιαίων διπόλων [53], το οποίο συμβάλλει σημαντικά στην προσρόφηση τους (Κεφ. 1.8.1).

4. Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται μια γενικότερη ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων, μέσω της οποίας υλοποιούνται βασικές επιδιώξεις της εργασίας αυτής. Αυτές περιλαμβάνουν κυρίως την μελέτη της παρουσίας και της συμπεριφοράς των τριαζολών στα απόβλητα, τόσο στην υγρή όσο και στη σωματιδιακή φάση. Επίσης αναφέρονται τα συμπεράσματα καθώς και κάποια βασικά επιτεύγματα τα οποία προέκυψαν κατά την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό των τριαζολών.

4.1. Συμπεράσματα που αφορούν στην ανάπτυξη και στην βελτιστοποίηση της αναλυτικής μεθόδου

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μία αναλυτική μέθοδος, η οποία επιτρέπει τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των τριαζολών (βενζοτριαζόλης, τολυλτριαζόλης και 5,6-διμέθυλο-βενζοτριαζόλης). Αυτή η μέθοδος εφαρμόστηκε για την ανάλυση δειγμάτων υγρής και σωματιδιακής φάσης τα οποία προέρχονταν τόσο από δείγματα του σταθμού βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων όσο κι από εμπορικά δείγματα (calgonit, skip, αντιψυκτικό). Η μελέτη των τελευταίων βασίστηκε στις ιδιότητες των ενώσεων αυτών να παρέχουν αντιοξειδωτική προστασία σε μεταλλικά μέρη, όπως είναι αυτά των πλυντηρίων πιάτων.

Τα βασικότερα επιτεύγματα και συμπεράσματα τα οποία προέκυψαν στην παρούσα εργασία είναι τα ακόλουθα:

1. Αναπτύχθηκε μια ιδιαίτερα ευαίσθητη κι επιλεκτική μέθοδος για την ανάλυση των ενώσεων: βενζοτριαζόλη, τολυλτριαζόλη και 5,6-διμέθυλο-βενζοτριαζόλη σε περιβαλλοντικά κι εμπορικά δείγματα, η οποία βασίζεται στην χρήση συνδυασμού υγρής χρωματογραφίας, ηλεκτροψεκασμού, διαδοχικής φασματομετρίας μαζών (HPLC-ES-

MS/MS). Η μέθοδος κατεργασίας των δειγμάτων, καθώς και το σύστημα ανίχνευσης βελτιστοποιήθηκαν, έτσι ώστε να είναι εφικτός ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των τριαζολών σε πολύ μικρές ποσότητες.

2. Η πρώτη εικόνα για την μελέτη των ενώσεων ελήφθη από σύστημα HPLC, χωρίς φασματομετρία μαζών. Η τεχνική όμως αυτή υστερούσε τόσο σε ακρίβεια όσο και σε ευαισθησία καθώς τα όρια ανίχνευσης στην περίπτωση αυτή ήταν μέχρι και τρεις τάξεις μεγέθους μεγαλύτερα από αυτά στην LC-ESI-MS/MS τεχνική. Άλλωστε η τελευταία τεχνική μας εξασφάλιζε ότι οι κορυφές οι οποίες λαμβάναμε αντιστοιχούσαν στις υπό μελέτη ενώσεις και όχι σε κάποιες οι οποίες απλώς παρουσίαζαν τον ίδιο χρόνο έκλουσης.
3. Στο παραπάνω, πολύ σημαντικό στάθηκε το στάδιο ελέγχου ύπαρξης παρεμπόδισης μήτρας, καθώς συνέβαλλε στον ακριβή προσδιορισμό των τριαζολών στα δείγματα τα οποία μελετήθηκαν. Έτσι, η πλέον κατάλληλη τεχνική για τον προσδιορισμό των βενζοτριαζολών στα δείγματα που μελετήθηκαν κρίνεται ότι είναι η μέθοδος προσθήκης γνωστής ποσότητας.
4. Απαιτούνταν καθημερινή παρασκευή κινητής φάσης γιατί σε διαφορετική περίπτωση παρατηρούνταν σημαντική μείωση του σήματος κατά τον ηλεκτροψεκασμό. Πιθανότατα, η μείωση αυτή να οφείλεται σε αθροιστική εναπόθεση ασβεστίου στην κινητή φάση από τις γυάλινες φιάλες των διαλυτών, γεγονός που οδηγεί στον μη αποδοτικό ηλεκτροψεκασμό των τριαζολών.
5. Προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες τιμές, στις οποίες θα πρέπει να ρυθμίζονται οι διάφορες λειτουργικές παράμετροι των οργάνων.
6. Το πιο κρίσιμο στάδιο στην κατεργασία των δειγμάτων ήταν η συμπύκνωση και τελικά η έκλυση των ενώσεων κατά την διεργασία της εκχύλισης στερεάς φάσης (solid phase extraction). Κι αυτό γιατί εάν ο βαθμός συμπύκνωσης ήταν χαμηλός τότε ήταν πιθανόν να φτάναμε κοντά στα όρια ανίχνευσης του οργάνου κι έτσι η

ποσοτικοποίηση των ενώσεων μας για το συγκεκριμένο δείγμα να μην ήταν ακριβής.

7. Επίσης, προσοχή απαιτούνταν κατά την διέλευση των δειγμάτων από τα φυσιγγία (cartridges), όσον αφορά τις ταχύτητες ροής. Πιο συγκεκριμένα για ταχύτητες ροής (κατά την εφαρμογή κενού) μεγαλύτερες των 5 ml/min η ανάκτηση των ενώσεων δεν ήταν ικανοποιητική. Αυτό αποδίδεται στην υψηλή διαλυτότητα των ενώσεων αυτών στο νερό, γεγονός που δρα ανταγωνιστικά σε σχέση με την πρόσδεση αυτών στο προσροφητικό υλικό του φυσιγγίου η οποία οδηγεί στην απομόνωση και την συμπύκνωση τους.
8. Παράλληλα, μεγάλη προσοχή δόθηκε στον χρόνο φιλτραρίσματος των δειγμάτων του βιολογικού προκειμένου να απομονωθεί η υγρή από την σωματιδιακή φάση. Αυτό πραγματοποιήθηκε κυρίως για λόγους επαναληψιμότητας της διεργασίας αυτής ώστε να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα διαφορετικών δειγματοληψιών. Αποτέλεσε όμως και αναγκαία συνθήκη επεξεργασίας των δειγμάτων αυτών ώστε το φαινόμενο της προσρόφησης (το οποίο εξαρτάται από τον χρόνο) να λαμβάνει χώρα σε ίσους περίπου χρόνους για διαφορετικά δείγματα ροής.
9. Τέλος, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι τριαζόλες οι οποίες πραγματεύεται η εργασία αυτή ανιχνεύτηκαν και προσδιορίστηκαν και στην σωματιδιακή φάση. Οδηγώντας μας έτσι στο συμπέρασμα ότι παρά τον ισχυρά υδρόφιλο χαρακτήρα τους` εμφανίζουν και ιδιότητες προσρόφησης οι οποίες συμβάλλουν στην δέσμευση τους στην φάση αυτή.
10. Θέλοντας να κάνουμε μία σύγκριση της τεχνικής, η οποία αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία, και των αποτελεσμάτων τα οποία ελήφθησαν με βιβλιογραφικά δεδομένα προκύπτει ο Πίνακας 4.1.

Πίνακας 4.1: Σύγκριση παρούσας μελέτης με άλλες αντίστοιχες

		Παρούσα εργασία	Stefan Weiss et.al.	Christian Schaffner et.al.	D. S. Hart et.al.
RT min	BZT	5,1	6,6 *	2,4 *	x
	TTA	6,1	9,9 *	2,6 *	
	5,6-DM-BZT	7,3	x	2,8 *	
Θραύσματα	BZT	39	x	x	x
		65	x	65	
		92	92	92	
	TTA	39	x	x	
		51	x	x	
		77	77	77	
	5,6-DM-BZT	79	79	79	
		39	x	x	
		51	x	93	
			77	77	
			91	91	
	Ανίχνευση της 5-6-DM-BZT	Ανάπτυξη μεθόδου ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού. Ανίχνευση της σε περιβαλλοντικά δείγματα	x	Δεν ανιχνεύτηκε σε περιβαλλοντικά δείγματα	
Ανάλυση εμπορικών δειγμάτων - Επαλήθευση ύπαρξης βενζοτριαζολών σε αυτά	1. Calgonit 2. Antifreeze 3. Skip	x	x	x	
Έλεγχος Παρεμπόδισης μήτρας	Θετικό αποτέλεσμα (Μέθοδος προσθήκη γνωστής ποσότητας)	Θετικό αποτέλεσμα (Response Factors)	x	x	
Έλεγχος προσρόφησης βενζοτριαζολών στην σωματιδιακή φάση	BZT, TTA, 5,6-DM-BZT: Απομόνωση και Ποσοτικός προσδιορισμός με LC-ES-MS/MS	x	x	BZT, TTA: HPLC and models	

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 4.1, το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία επιφέρει καλύτερο χρωματογραφικό διαχωρισμό σε σχέση με αυτά της ισοκρατικής έκλουσης (Stefan Weis et al. and Christian Schaffner et al.). Επίσης η χρήση περισσότερων από δύο θραυσμάτων μας επιτρέπει να υποθέσουμε με μεγαλύτερη ακρίβεια τους μηχανισμούς θραυσματοποίησης. Παράλληλα ο έλεγχος παρεμπόδισης μήτρας και η ανάπτυξη μιας τεχνικής (προσθήκη γνωστής ποσότητας) για τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των βενζοτριαζολών καθιστούν την παρούσα εργασία περισσότερο «έγκυρη», όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό, σε σχέση με τις υπόλοιπες εργασίες (Christian Schaffner et al.). Επίσης η παρούσα εργασία πέρα από την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας αναλυτικής τεχνικής για τον προσδιορισμό των βενζοτριαζολών σε υγρή και σωματιδιακή φάση έγινε και εφαρμόσιμη σε περιβαλλοντικά κι εμπορικά δείγματα. Τα τελευταία δε αποτέλεσαν απόδειξη της χρήσης των τριαζολών σε χημικά σκευάσματα τα οποία πρέπει να παρέχουν και προστασία έναντι της οξείδωσης μεταλλικών

επιφανειών. Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι μόνο στην παρούσα εργασία μελετήθηκε πλήρως και τελικά ανιχνεύτηκε και σε περιβαλλοντικά δείγματα η 5,6-DM-BZT, με σημαντική μάλιστα παρουσία στην σωματιδιακή φάση. Τέλος, κρίνεται αναγκαίο να αναφερθεί ότι εντοπίστηκε προσρόφηση και των άλλων δύο βενζοτριαζολών: BZT και TTA, στην σωματιδιακή φάση παρά τον υδρόφιλο χαρακτήρα και την διαλυτότητα τους στο ύδωρ. Το ποσοστό προσρόφησης υπολογίστηκε καθώς χρησιμοποιήθηκαν αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν με χρήση της τεχνικής LC-MS/MS, η οποία παρέχει μεγαλύτερη ακρίβεια σε σχέση με αυτήν της HPLC η οποία αναγράφεται στην τελευταία στήλη του προηγούμενου πίνακα (D. S. Hart et al.).

4.2. Συμπεράσματα τα οποία προέκυψαν από την μελέτη περιβαλλοντικών δειγμάτων

Όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων στα δείγματα που προαναφέρθηκαν τα κυριότερα συμπεράσματα τα οποία προκύπτουν είναι τα εξής:

1. Οι προς ανάλυση ενώσεις προσδιορίζονται σε επίπεδα της τάξης μεγέθους των $\mu\text{g/l}$ για την υγρή φάση και $\mu\text{g/g}$ για την σωματιδιακή φάση.
2. Από μελέτες που έχουν γίνει σε άλλες χώρες (Christian Schaffner and Walter Giger, Swiss Federal Institute for Environmental Science and Technology) για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των τριαζολών σε υδατικά συστήματα έχουν προκύψει τα ακόλουθα αποτελέσματα:

<i>Σ.Β.Ε.Λ.</i>	Zagreb	Dubendorf	Niederglatt
BZT (Είσοδος $\mu\text{g/l}$)	4,5	16,9	64
BZT (Εξοδος $\mu\text{g/l}$)	0,06	11,0	82
TTA (Είσοδος $\mu\text{g/l}$)	5,9	2,3	3,2
TTA (Εξοδος $\mu\text{g/l}$)	0,8	0,7	2,3

Όπως παρατηρείται, οι ενώσεις BZT και TTA ανιχνεύονται στα ύδατα κι αυτών των περιοχών. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στις χώρες αυτές δεν γίνεται ανίχνευση της 5,6-διμέθυλο-βενζοτρίαζόλης, και μάλιστα κατά την μελέτη που διεξάγουν την χρησιμοποιούν σαν εσωτερικό πρότυπο. Αυτό μαρτυρεί ότι η ένωση αυτή δεν υπάρχει στα υδατικά δείγματα τα οποία μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα όμως της παρούσας εργασίας αποδεικνύουν την ύπαρξη της ένωσης αυτής σε δείγματα τα οποία ελήφθησαν από τον βιολογικό σταθμό επεξεργασίας αποβλήτων της πόλης του Ηρακλείου.

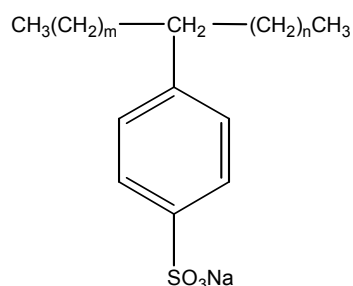
3. Η παραπάνω διαφορά μπορεί να αποδοθεί σε διαφορετική διαχείριση των λυμάτων από περιοχή σε περιοχή. Είναι άλλωστε γνωστό ότι το σύστημα διαχείρισης αποβλήτων σε χώρες όπως είναι η Ελβετία είναι αρκετά πιο οργανωμένο και αυστηρό σε σχέση με αυτό της Ελλάδας.
4. Την παραπάνω θέση ενισχύει το γεγονός ότι ο βιολογικός σταθμός απ' όπου έγινε η δειγματοληψία δέχεται απόβλητα από βενζινάδικα και φανοποιεία. Τα λύματα τα οποία προέρχονται από τους χώρους αυτούς πιθανότατα περιέχουν αντιπηκτικές ουσίες αυτοκινήτων, οι οποίες όπως αποδείχτηκε κατά την παρούσα ανάλυση περιέχουν την 5,6-διμέθυλο-βενζοτρίαζόλη. Σε συγκέντρωση περίπου ίση με 3 μg/l.
5. Στο παραπάνω δείγμα αντιπηκτικού υγρού ανιχνεύθηκε και η τολυλτρίαζόλη σε συγκέντρωση ≈ 374 μg/l. Η βενζοτρίαζόλη ανιχνεύτηκε σε απορροπαντικό πλυντηρίου πιάτων σε ποσότητα ≈ 60 μg/g. Συνεπώς η παρουσία των ενώσεων αυτών στα λύματα του βιολογικού δικαιολογείται εάν λάβουμε υπόψη μας ότι δέχεται και οικιακά λύματα.
6. Η αναλογία των ενώσεων αυτών στα παραπάνω εμπορικά δείγματα δεν μπορεί να μας δώσει ακριβείς πληροφορίες για την τελική συγκέντρωση των ενώσεων αυτών στα λύματα καθώς είναι πολύ πιθανόν να υπάρχουν κι άλλες πηγές απ' όπου προέρχονται οι τρίαζόλες αυτές κι απλώς ο χώρος της βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων δρα σαν αποδέκτης.

7. Αξιζει να αναφέρουμε ότι η βιβλιογραφία δεν αναφέρει την παρουσία της 5,6-διμέθυλο-βενζοτριαζόλης σε εμπορικά δείγματα. Η παρουσία της αναφέρεται μόνο σε μία δημοσίευση (Cancilla, 1997) όπου η ένωση αυτή φαίνεται να περιέχεται σε αντιψυκτικά υγρά των αεροδρομίων (ADAFs: Aircraft Deicing Fluids) όπως αναφέρθηκε και στο Κεφ. 1.3. Η παρουσία όμως των άλλων δύο τριαζολών στα δείγματα τα οποία μελετήθηκαν ήταν αναμενόμενη καθώς υπήρχαν αναφορές στην βιβλιογραφία γι' αυτά. Έτσι προϊόντα όπως το Calgonit (απορρυπαντικό πλυντηρίου πιάτων) και ένα αντιψυκτικό αυτοκινήτων αποδείχθηκε ότι περιέχουν τις ενώσεις αυτές.
8. Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη τα αποτελέσματα που προκύπτουν κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των τριαζολών στα δείγματα του βιολογικού σταθμού προκύπτει ότι δεν υπάρχει αλληλουχία στην κατανομή και την ποσότητα των υπό μελέτη ενώσεων στα δείγματα τα οποία ελήφθησαν. Αυτό συμβαίνει γιατί τα δείγματα τα οποία ελήφθησαν από τον σταθμό επεξεργασίας λυμάτων δεν αντιστοιχούν σε αντιπροσωπευτικά δείγματα, αλλά ο σκοπός της λήψης τους ήταν η εφαρμογή της αναλυτικής τεχνικής η οποία αναπτύχθηκε αλλά και ο ποσοτικός προσδιορισμός των τριαζολών σε αυτά.
9. Αξιοσημείωτο μάλιστα είναι το γεγονός ότι στην μία εκ των τριών δειγματοληψιών (Νοέμβριος, δείγμα εισόδου) η κατανομή των τριαζολών μεταξύ στερεάς και σωματιδιακής φάσης δεν συμφωνεί με τον υδρόφιλο χαρακτήρα τους.
10. Θέλοντας να συγκρίνουμε τους συντελεστές προσρόφησης για δύο διαφορετικές δειγματοληψίες, και θεωρώντας ότι επικρατούν οι ίδιες συνθήκες τόσο ως προς την συγκέντρωση της προσροφόμενης ένωσης όσο και ως προς την ποιότητα του προσροφητικού μέσου, θα αναμένονταν να μην υπάρχει σημαντική απόκλιση μεταξύ των δύο χρονικά διαφορετικών συντελεστών προσρόφησης. Όμως, όπως προκύπτει από τα πειραματικά δεδομένα, υπάρχει απόκλιση των

συντελεστών αυτών για δείγματα τα οποία προέρχονται από ίδια στάδια επεξεργασίας αποβλήτων.

11. Η παραπάνω απόκλιση μπορεί να αποδοθεί στον διαφορετικό χρόνο παραμονής των λυμάτων στις δεξαμενές κατά τις δύο διαφορετικές δειγματοληψίες.
12. Άλλος ένας λόγος στον οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί η διαφορετικότητα των συντελεστών προσρόφησης σε αυτές τις δύο δειγματοληψίες, είναι η διαφορετική ποιότητα του προσροφητικού μέσου, δηλαδή των σωματιδίων.
13. Σημαντική βέβαια είναι και η επίδραση της ποσότητας των σωματιδίων (particle concentration effect) στην προσρόφηση των οργανικών ενώσεων. Η πιθανότερη εκδοχή η οποία δικαιολογεί αυτήν την εξάρτηση αυτή είναι ότι οι κρούσεις μεταξύ των σωματιδίων εκτοπίζουν τις προσροφημένες ουσίες από την επιφάνεια των στερεών. Έτσι υψηλότερες συγκεντρώσεις σωματιδίων συνεπάγονται πολλαπλάσιες κρούσεις επιφέροντας έτσι μία μορφή εκρόφησης η οποία οδηγεί σε χαμηλότερες προσροφηθείσες ποσότητες των ενώσεων σε αυτά.
14. Πρέπει να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού είναι συγκρίσιμα μόνο για την δεύτερη (Νοέμβριος) και τρίτη δειγματοληψία (Δεκέμβριος), καθώς στην πρώτη δεν έγινε έλεγχος ύπαρξης παρεμπόδισης μήτρας, η οποία όπως αποδείχτηκε ήταν υπαρκτή. Έτσι οι συγκεντρώσεις που προέκυψαν για την υγρή φάση ήταν μικρότερες απ' ότι στην πρώτη δειγματοληψία.
15. Στην έλλειψη δυνατότητας ακριβούς σύγκρισης συμβάλλει και το γεγονός ότι πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές χρονικές περιόδους.
16. Αντίστοιχη μελέτη κατανομής μεταξύ υγρής και σωματιδιακής φάσης έχει πραγματοποιηθεί σε δείγματα του βιολογικού σταθμού επεξεργασίας λυμάτων για ενώσεις όπως είναι τα γραμμικά αλκυλοβενζοσουλφονικά άλατα (LAS: Linear Alkylbenzene Sulfonates). Πρόκειται για επιφανειοδραστικές ενώσεις, και όπως όλες

οι ενώσεις τις κατηγορίας τους επιδεικνύουν αμφίφιλη συμπεριφορά. Αυτό συμβαίνει εξ' αιτίας της υδρόφοβης αλκυλικής αλυσίδας τους και της υδρόφιλης σουλφονομάδας. Η ιδιότητα τους αυτή τα καθιστά ως το βασικότερο ενεργό συστατικό σε απορρυπαντικά προϊόντα. Η δομή των ενώσεων αυτών παριστάνεται στο Σχήμα 4.1.



Σχήμα 4.0.1: Δομή LAS

Ο λόγος που γίνεται αναφορά στις ενώσεις αυτές είναι η σύγκριση της κατανομής αυτών των ενώσεων με αυτήν των τριαζολών μεταξύ υγρής και σωματιδιακής φάσης. Έτσι τα LAS σε αντίθεση με τις ενώσεις που μελετώνται στην παρούσα εργασία εμφανίζουν αρκετά υψηλότερους συντελεστές προσρόφησης K_d , μέχρι και 550.576 l/kg.[54] Έτσι οι ενώσεις αυτές προσροφούνται σε πολύ μεγάλο βαθμό στην σωματιδιακή φάση οδηγώντας έτσι σε αύξηση της κατανομής τους σε αυτήν σε σχέση με την υγρή φάση. Το παραπάνω είναι αποτέλεσμα τη παρουσίας του υδρόφοβου τμήματος στις ενώσεις αυτές το οποίο τις καθιστά ισχυρά λιπόφιλες σε αντίθεση με τις τριαζόλες οι οποίες χαρακτηρίζονται από υδρόφιλη δραστηριότητα.

4.3. Εναλλακτικοί τρόποι επεξεργασίας αποβλήτων - Προτεινόμενες λύσεις

Τα απόβλητα που προκύπτουν από τις διαδικασίες «deicing» των αεροσκαφών αποτελούν σοβαρή απειλή για το περιβάλλον εξαιτίας:

- Της χρήσης μεγάλων ποσοτήτων τέτοιου είδους χημικών παρασκευασμάτων

- Της υψηλής βιολογικής ζήτησης οξυγόνου (oxygen demand) των γλυκολών προπυλενίου και αιθυλενίου
- Της τοξικότητας που συνδέεται με τις πρόσθετες ουσίες, όπως η βενζοτρίαζόλη

Προτεινόμενη λύση [55]:

Ενδεχομένως να είναι δυνατή η εκμετάλλευση της βλάστησης (έδαφος, τεχνητοί υδροβιότοποι) με δύο διάφορους τρόπους:

- ✓ Αύξηση της βιοδιάσπασης των γλυκολών από τη συνύπαρξη ριζών και βακτηριδίων
- ✓ Μετασχηματισμός των τριαζολών από τις ενζυματικές δραστηριότητες των φυτών.

Σε ένα σύστημα επεξεργασίας, η «φυτομετατροπή» των τριαζολών μπορεί να αποτελέσει μια συμβατική βιολογική επεξεργασία υγρών αποβλήτων, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην υποβάθμιση γλυκόλης.

Επίσης, πιθανόν να συνέβαλε σημαντικά σε αυτό και η αποικοδόμηση των ενώσεων μέσω φωτοαποικοδόμησης.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Cornell, J. S., Pillard, D. A. and Hernandez, M. T., (2000). "Comparative measures of the toxicity of component chemicals in aircraft deicing fluids". Environ. Toxicol. and Chem. 19, 1465-1472.
- [2] Corsi, S.R., Hall, D.W. and Geis, S.W.: 2001a. "Aircraft and runway deicers at general Mitchell international airport - Milwaukee, Wisconsin, USA. 1. Biochemical oxygen demand and dissolved oxygen in receiving streams". Environ. Toxicol. and Chem., 20, 1474-1482.
- [3] Electronic reference: <http://www.sigma.sial.com>
- [4] Cancilla, D.A., A. Holtkamp, L. Matassa and X. Fang, (1997). "Isolation and Characterization of Microtox[®] Active Components from Aircraft Deicing/Anti-icing Fluids.", Environmental Toxicology and Chemistry, 16(3): 430-434.
- [5] Hartwell, S.I., Jordahl, D.M., (1995). "Toxicity of Aircraft Deicer and Anti-icer Solutions to Aquatic Organisms". Environmental Toxicology and Chemistry. 14(8): 1375-1386.
- [6] Cornell, Jeff S., Pollard, David A., Hernandez, Mark T., (1998). "Chemical Components of Aircraft Deicer Fluid: How They Affect Propylene Glycol Degradation Rates and Deicing Waste Stream Toxicity". Water Environment Federation Technical Conference, Orlando, FL.
- [7] Preliminary Data Summary, Airport Deicing Operations (Revised), EPA
- [8] Eric C. Ward, Al L. Foster, and Dane E. Glaser. "Finally, an Alternative to Azoles". Alco Chemical, Chattanooga, TN 37406
- [9] NASA, Downs, R.W., (1968). "Chemically Inducted Ignition in Aircraft and Spacecraft Electrical Circuitry by Glycol/Water Solutions." NASA Manned Spacecraft Center, Houston.
- [10] Eric C. Ward, Al L. Foster, and Dane E. Glaser. "Finally, an Alternative to Azoles".

- [11] T.C. Breske, (1984). "The Destruction of Tolyltriazole Inhibitor by Chlorination of Cooling Water". Corrosion: p. 51-52.
- [12] O. Hollander, R.C. May, (1985). "The Chemistry of Azole Copper Corrosion Inhibitors in Cooling Water". Corrosion: p. 39-44.
- [13] R. Holm, D. Berg, F. Lu, D. Johnson, J. Eickmans, D. Holtkamp, A. Benninghoven, (1992). "The Impact of Chlorine on Tolyltriazole and Butylbenzotriazole Corrosion Inhibitor Films on Copper". International Water Conference: No. IWC-92-40.
- [14] European Commission, (2003). Technical guidance document on risk assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment of new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Part II. European Commission Joint Research Centre. EUR 20418 EN/2.
- [15] F. Lu, N. M. Rao, B. Yang, J.E. Hoots, R.S. Budrys, (1994). "Effect of Halogenation on YellowMetal Corrosion: Inhibition by Triazoles". Corrosion: p. 430.
- [16] Alison Robertson and Palle Pedersen. "Understanding Fungicides: II: Strobilurins, triazoles and chlorothalonil".
- [17] Electronic reference:
[pharmacology.creighton.edu/ Antifungal%20Drugs%20powerpoint2002.ppt](http://pharmacology.creighton.edu/Antifungal%20Drugs%20powerpoint2002.ppt)
- [18] Cancilla, D. A., Holtkamp, A., Matassa, L. and Fang, X., (1997). "Isolation and characterization of Microtox-active component from aircraft deicing/anti-icing fluids". *Environ. Toxicol. and Chem.* 16, 430-434.
- [19] Cancilla, D.A., A. Holtkamp, L. Matassa, and X. Fang, (1997). "Isolation and characterization of Microtox-active components from aircraft de-icing/anti-icing fluids". *Environ. Toxicol. And Chem.*, 16:430-434.
- [20] Hartwell, S.I., D.M. Jordahl, J.E. Evans, and E.B. May, (1995). "Toxicity of aircraft deicer and antiicer solutions to aquatic organisms". *Environ. Toxicol. and Chem.*, 14:1375-1386.

- [21] *Hartwell, S.I., D.M. Jordahl, J.E. Evans, and E.B. May, (1995). "Toxicity of aircraft deicer and antiicer solutions to aquatic organisms". Environ. Toxicol. and Chem., 14:1375-1386.*
- [22] *Electronic reference: <http://www.epa.gov/chemrtk/benzo/c13456tp.pdf>.*
- [23] *Clayton, G.D., F.E. Clayton (1993-1994). "Patty's Industrial Hygiene and Toxicology." Volumes 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F: Toxicology. 4th ed. New York.*
- [24] *Clayton, G.D., F.E. Clayton (1993-1994). "Patty's Industrial Hygiene and Toxicology." Volumes 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F: Toxicology. 4th ed. New York.*
- [25] *Electronic reference: <http://www.epa.gov/chemrtk/benzo/c13456tp.pdf>.*
- [26] *Maagd, P. G-J., Sinnige, Theo L., Schrap, S. Marca, Opperhuizen, A., Sijm, D., (1998). "Sorption Coefficients of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for Two Lake Sediments: Influence of the Bactericide Sodium Azide." Environmental Toxicology and Chemistry, 17(10): 1899-1907.*
- [27] *Schwarzenbach, Philip M., Gschwend, and Dieter, Imboden M., (1993). Environmental Organic Chemistry, Wiley & Sons, Inc., New York, NY.*
- [28] *Ferrante, Dan A., Gallagher, Daniel L., (1998). "Groundwater Pollution Primer". Class Notes, Civil Engineering Department, Virginia Tech University.*
- [29] *Gijs D. Breedveld, Roger Roseth, Magnus Sparrevik, Thomas Hartnik and Lars J. Hem, (2002). "Persistence of the de-icing additive benzotriazole at an abandoned airport". Environmental Research, Ås, Norway; and 4Aquateam, Oslo, Norway.*
- [30] *W. J. Weber, P. M. McGinney, L. E.. Katz, (1991). "Sorption phenomena in subsurface systems: concepts, models and effects on contaminant fate and transport". Water Research, 25, 499-528.*
- [31] *Schwarzenbach, R. P., Gschwend, P. M. and Imboden, D. M., (1993). Environmental Organic Chemistry, John Wiley & Sons, New York, 681 pp.*
- [32] *X. Wu, N. Chou, D. Lupher, and L.C. Davis. "Benzotriazoles: Toxicity and degradation". Department of Biochemistry, Kansas State University, Manhattan.*
- [33] *Electronic reference: <http://www.epa.gov/chemrtk/benzo/c13456tp.pdf>
AOP program, version 1.89. EPIWIN modelling Program. W. Meylan and P. Howard (1999)*

- [34] Environmental Protection Agency (EPA)
- [35] *Boyer JH, Selvarajan R, (1979). "Ionisation constants of organic acids in aqueous solution". J Heterocycl Chem 6: 503-6 (4).*
- [36] *Pitter P., Simanova J., (1978). "Relation between the molecular structure & biodegradability of organic compounds. (VIII) Biodegradability of nitrogen heterocyclic compounds". Chem-Technol. Praze, F: Technol. Vody Prostredi, F22, 93.*
- [37] *Electronic reference:*
www.jlscience.com/images/chromato/chromafix02.gif
- [38] *Electronic reference:*
www.chemistry.adelaide.edu.au/.../images/spe/png
- [39] *Electronic reference:* www.waters.com
- [40] *Electronic reference:* www.auxilab.com
- [41] *Electronic reference:* www.sciequip.com.cn
- [42] *Θ. Π. Χατζηγιωάννου, Μ. Α. Κουμπάρης. Ενόργανη Ανάλυση, σελ. 482.*
- [43] *Simon J. Gaskell (1997). "Electrospray: Principles and Practice". J. Mass Spectrom. 32, p. 679-680.*
- [44] *Nadga b. Cech and Christie G. Enke (2001). "Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals". J. Mass Spectrom. 32, p. 679-680.*
- [45] TSQ Quantum Operators Course
- [46] *Electronic reference:* www.chromatography-online.org.
- [47] Paul Skelton & Paul Gates August 2000
- [48] *Θ. Π. Χατζηγιωάννου, Μ. Α. Κουμπάρης. Ενόργανη Ανάλυση, 2000, σελ. 9.*
- [49] *S. Geib, J. W. Einax, (2001). Comparison of detection limits in environmental analysis – is it possible? An approach on quality assurance in the lower working range by verification.*
- [50] *S. Geib, J. W. Einax, (2001). Comparison of detection limits in environmental analysis – is it possible? An approach on quality assurance in the lower working range by verification.*
- [51] *Θ. Π. Χατζηγιωάννου, Μ. Α. Κουμπάρης. Ενόργανη Ανάλυση, 2000, σελ. 280.*

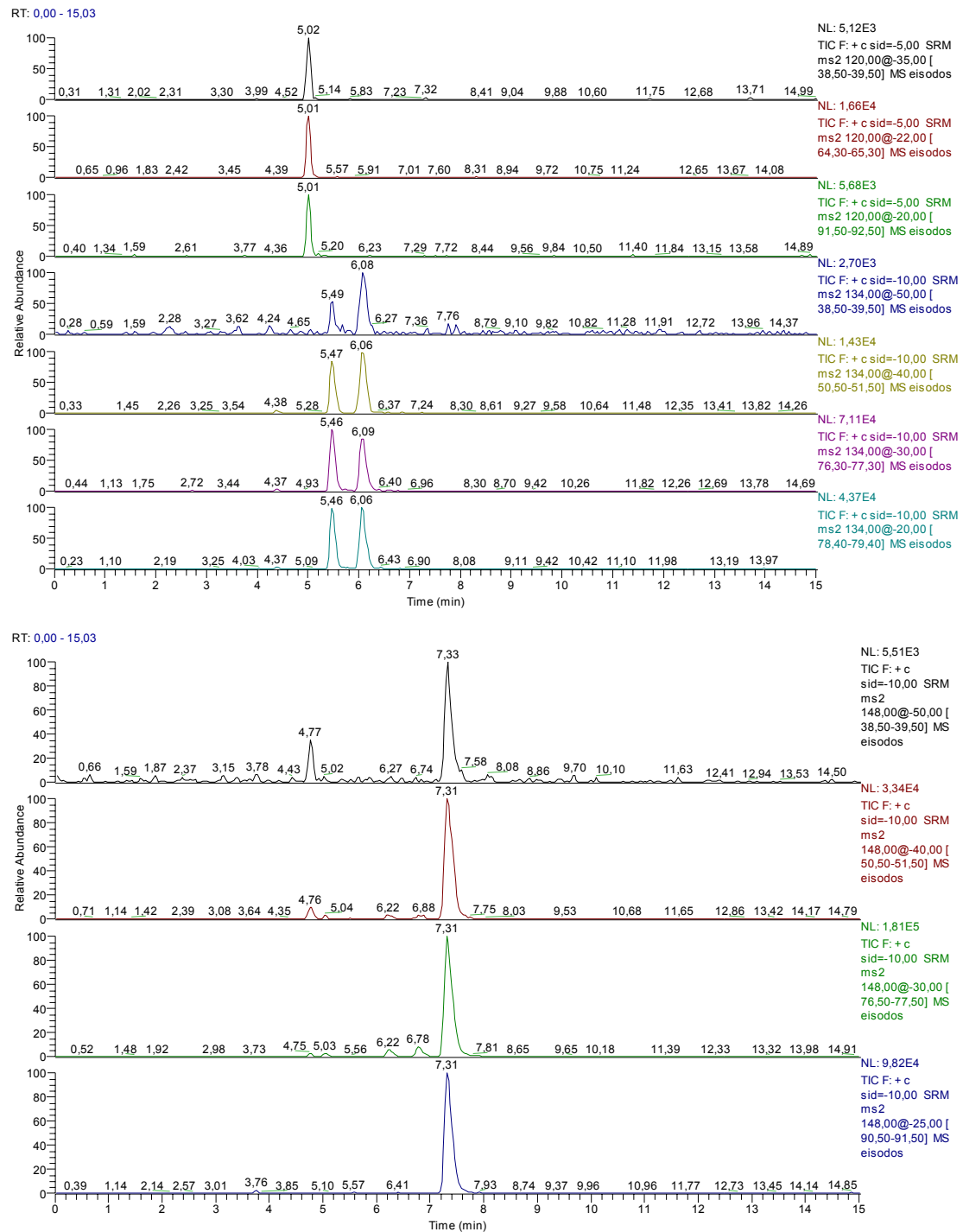
- [52] *S.W. Karickhoff, D.S. Brown, T.A. Scott, (1979). Water Res. 13, 241.*
- [53] *D.S. Hart , L.C. Davis *, L.E. Erickson , T.M. Callender (2003). "Sorpton and partitioning parameters of benzotriazole compounds". Department of Chemical Engineering, Kansas State University, Manhattan.*
- [54] Δημήτριος Ζέρβας, «Μελέτη του γίνεσθαι των γραμμικών αλκυλοβενζοσουλφονικών αλάτων σε μονάδα επεξεργασίας λυμάτων μέσω μετρήσεων πεδίου και μαθηματικών προσομοιώσεων» Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- [55] *Sigifredo Castro, Lawrence C. Davis, Larry E. Erickson. "Review Natural, cost-effective, and sustainable alternatives for treatment of aircraft deicing fluid waste". Department of Chemical Engineering, Kansas State University, Manhattan.*

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

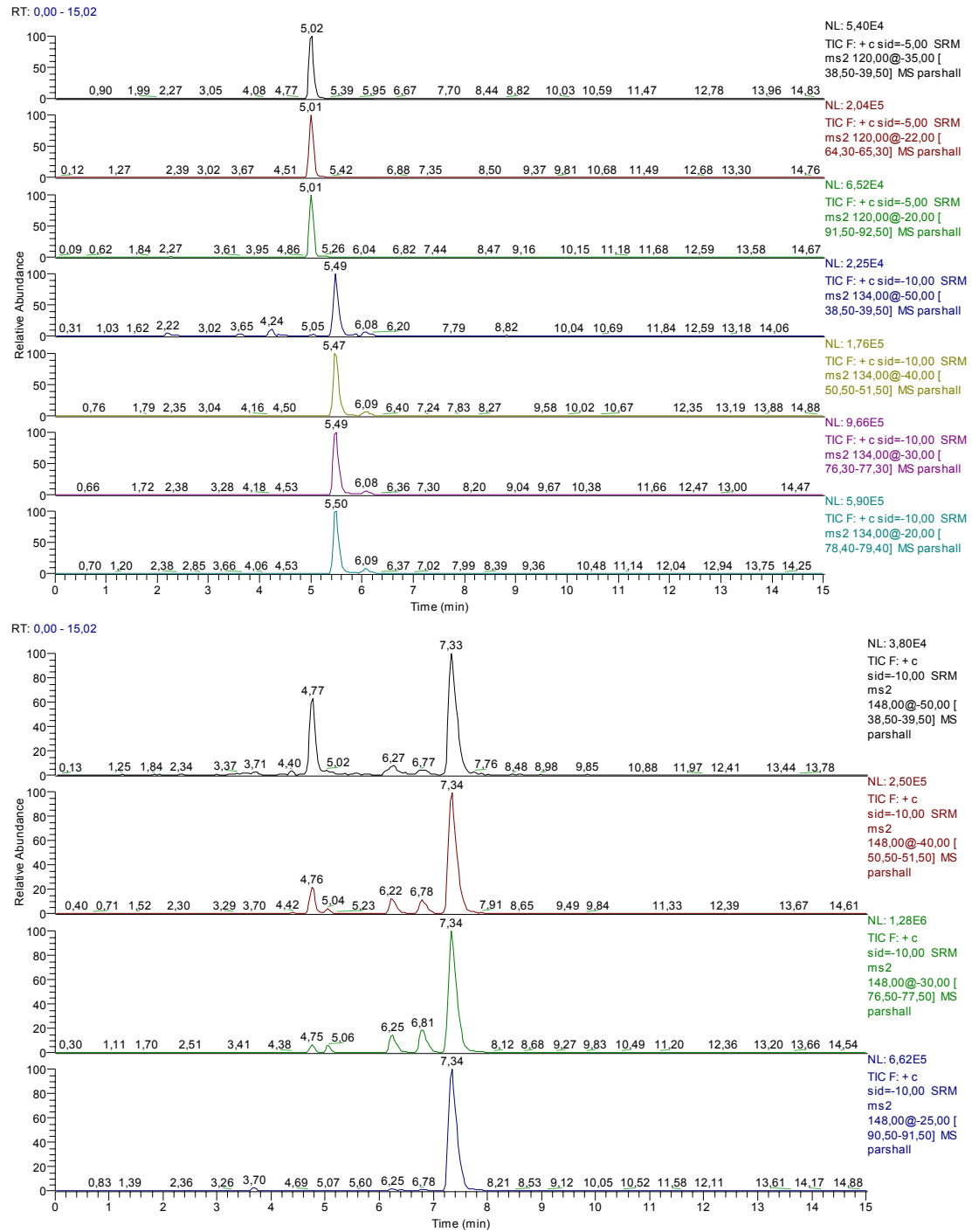
7.1. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Α. Υγρά Απόβλητα

Α1. Δειγματοληψία Νο 1

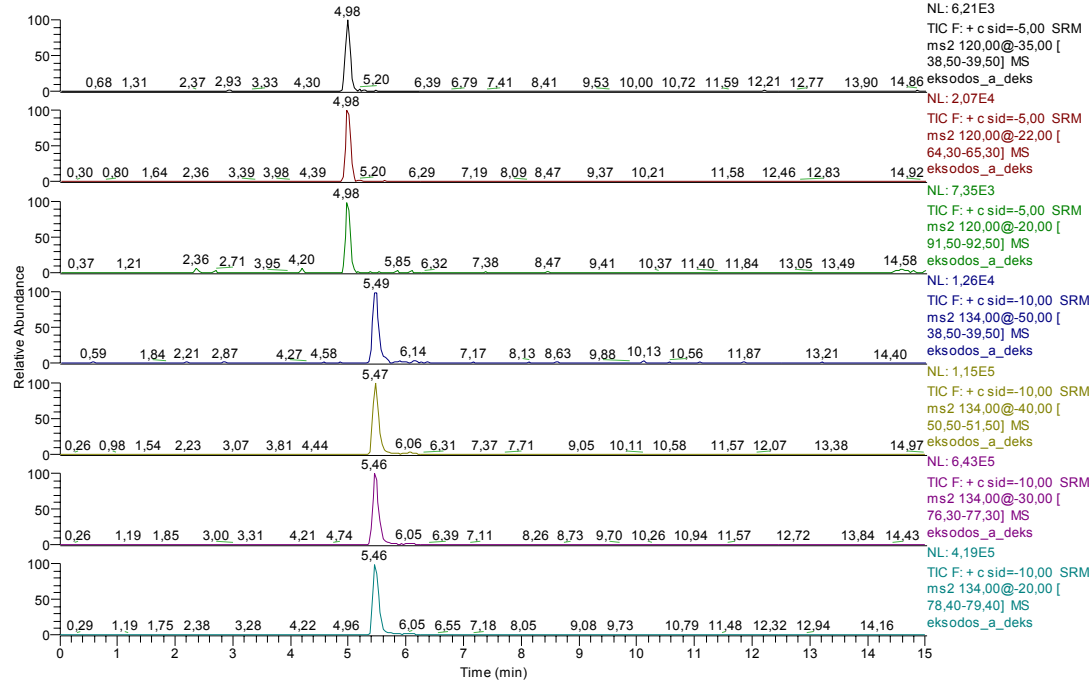


Χρωματογράφημα 7.1: Είσοδος - 10 φορές αραιώση (10/06/2005)

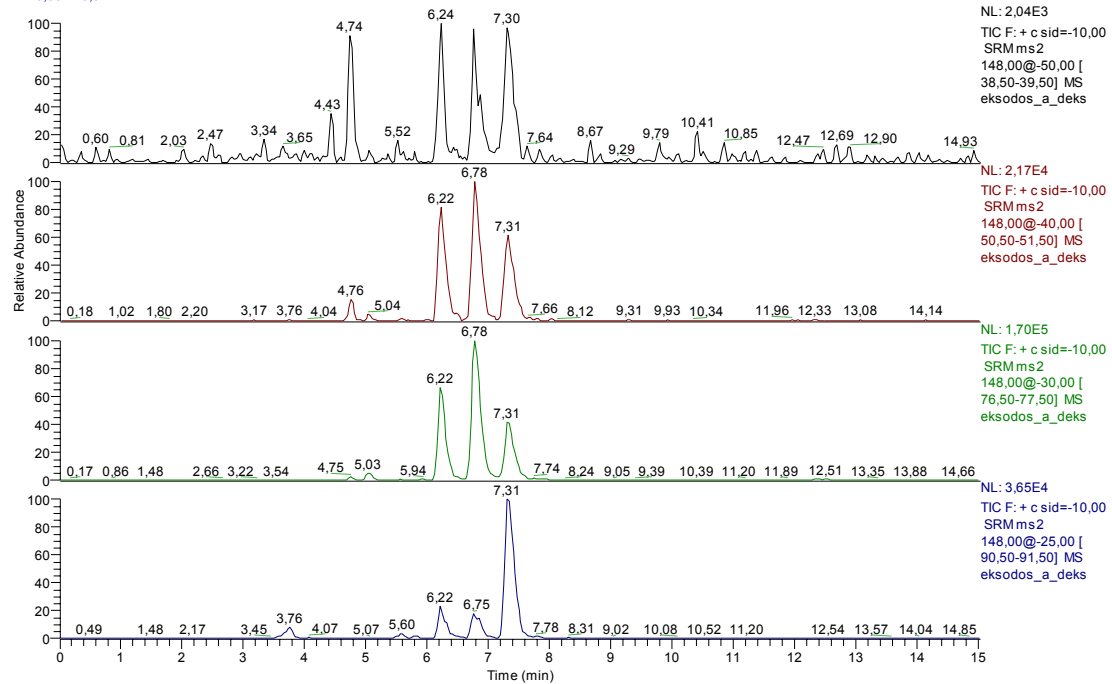


Χρωματογράφημα 7.2: Δίαισλος Parshall (10/06/2005)

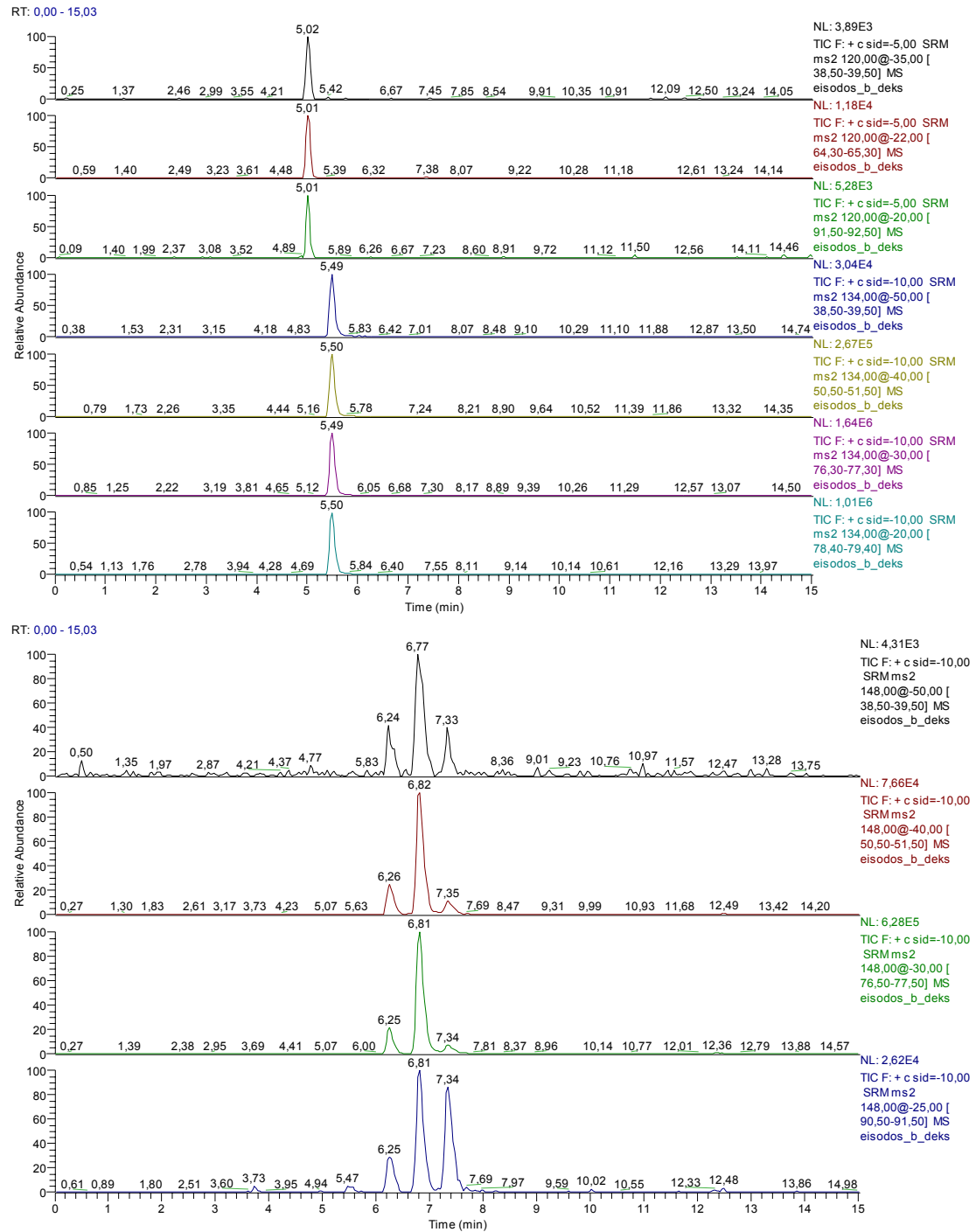
RT: 0,00 - 15,02



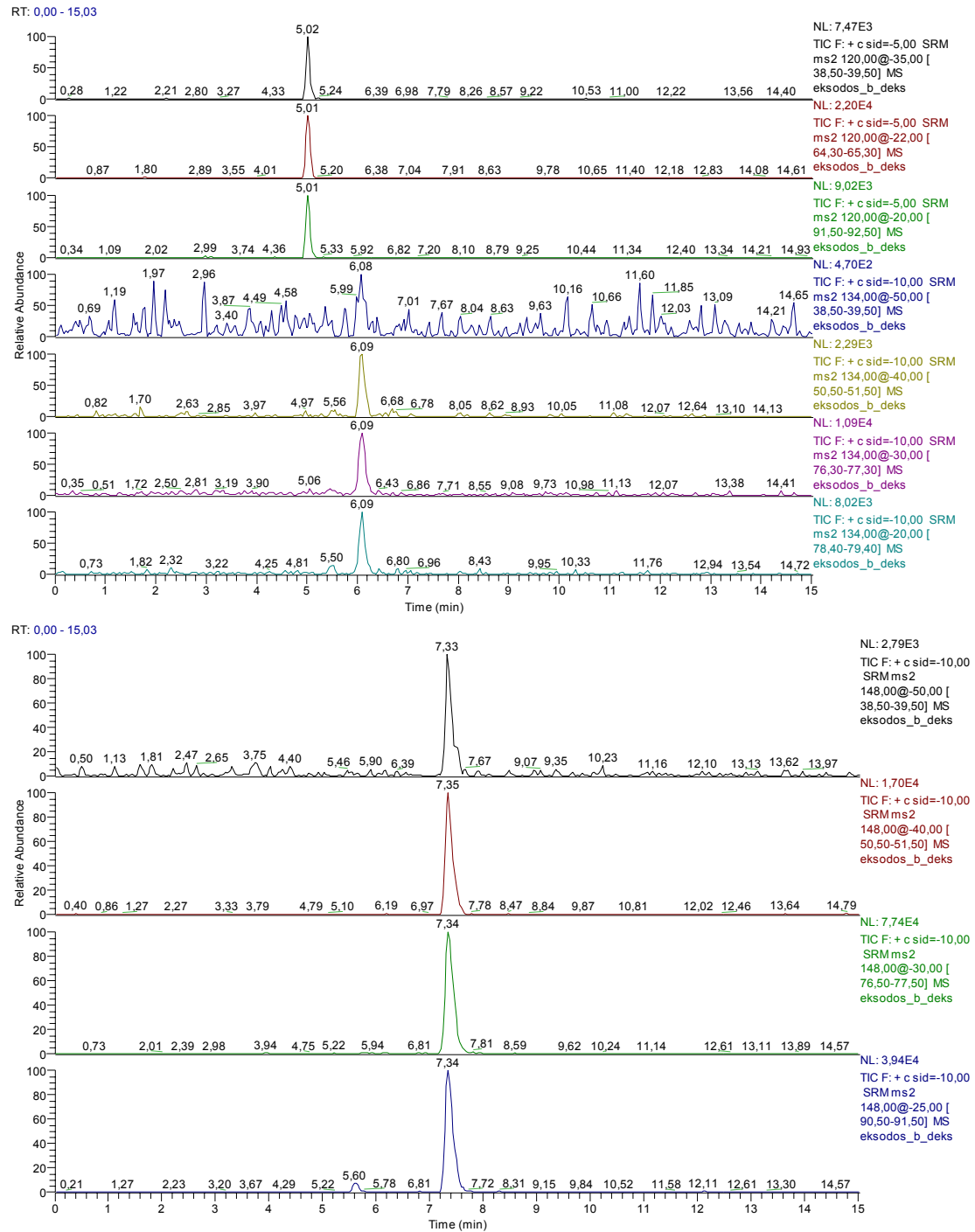
RT: 0,00 - 15,02



Χρωματογράφημα 7.3: Α' Δεξαμενή Καθίζησης - 20 φορές αραιώση (10/06/2005)

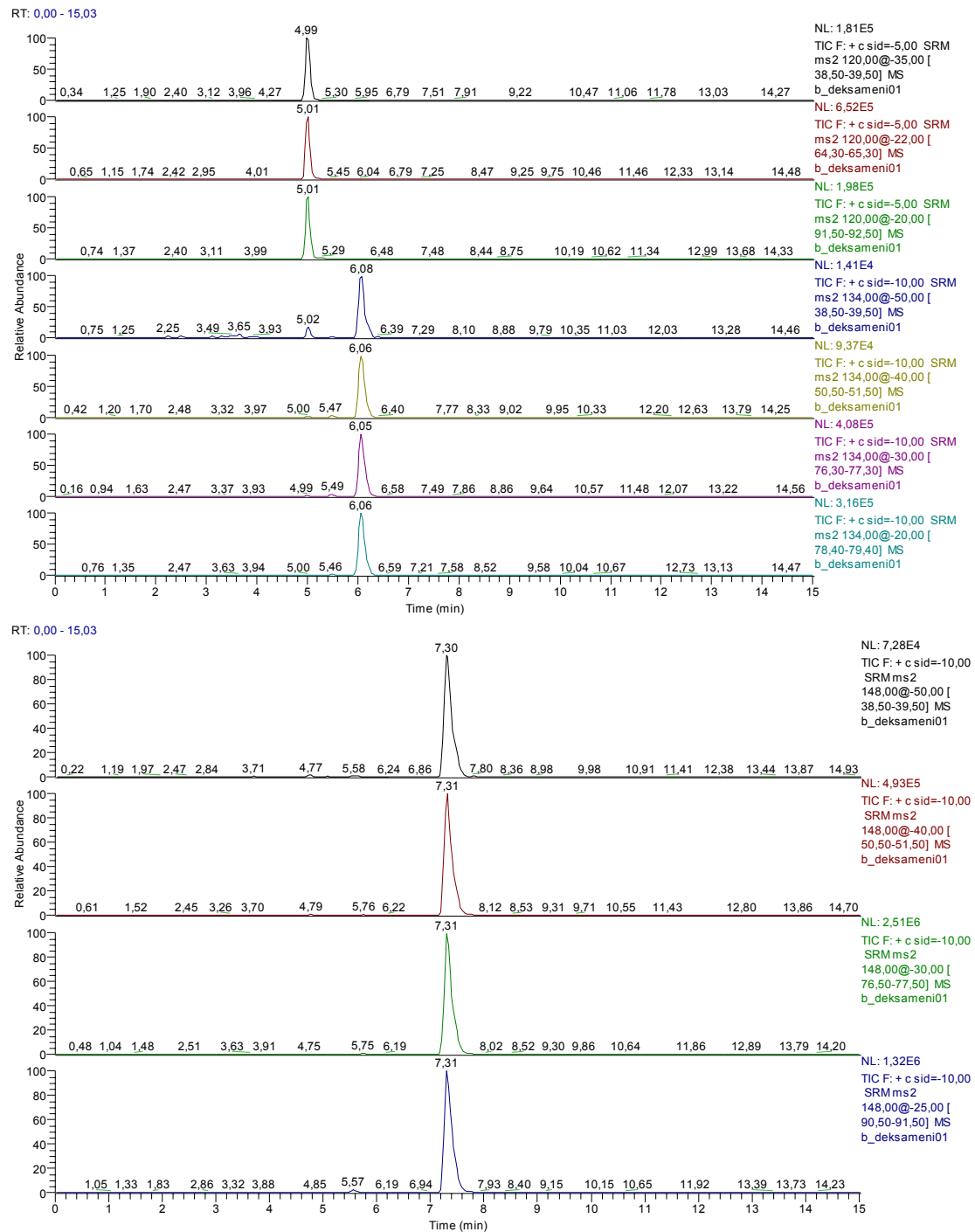


Χρωματογράφημα 7.4: Είσοδος Β' Δεξαμενής Καθίζησης - 100 φορές αραιώση (10/06/2005)

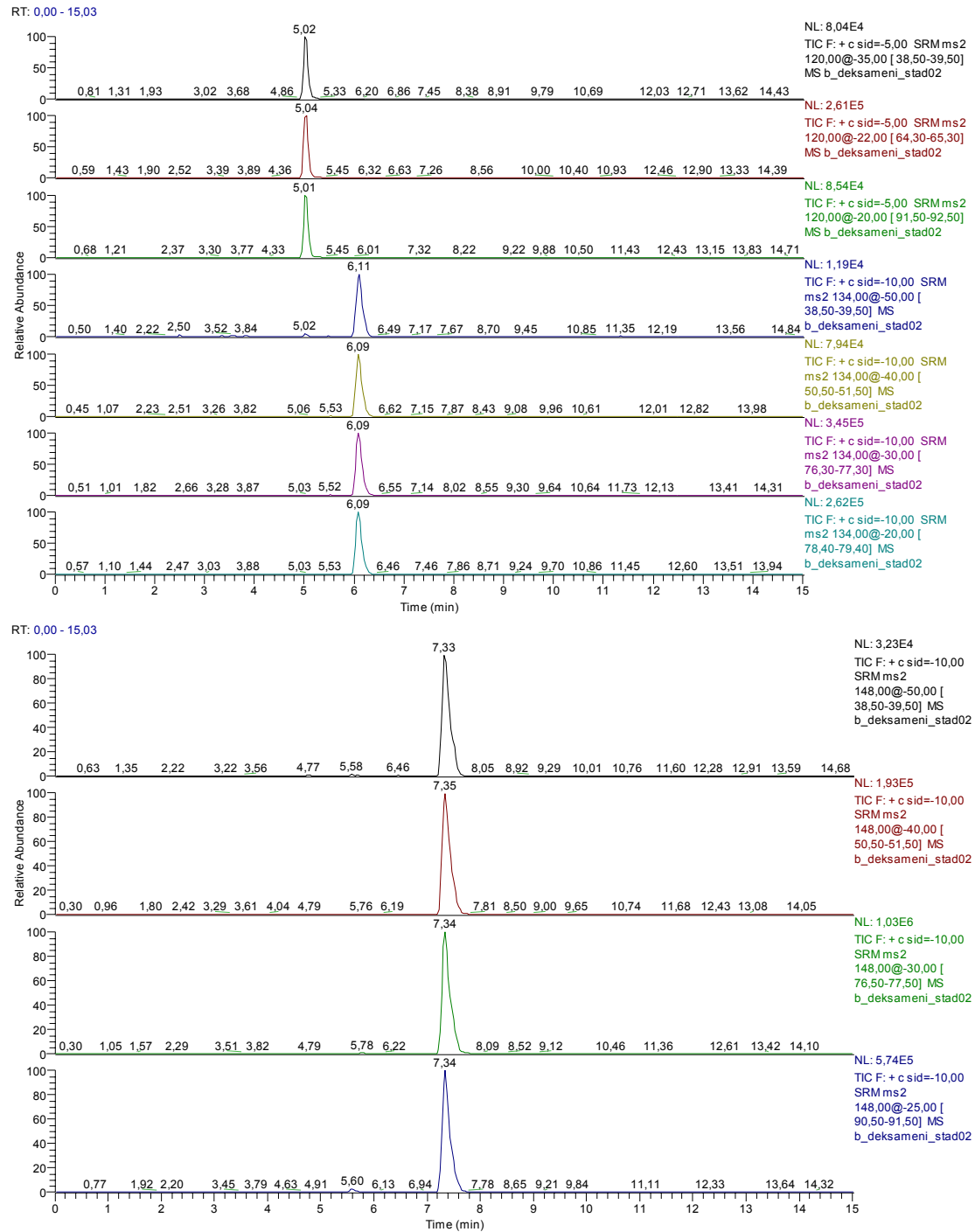


Χρωματογράφημα 7.5: Έξοδος Β' Δεξαμενής Καθίζησης - 20 φορές αραιώση (10/06/2005)

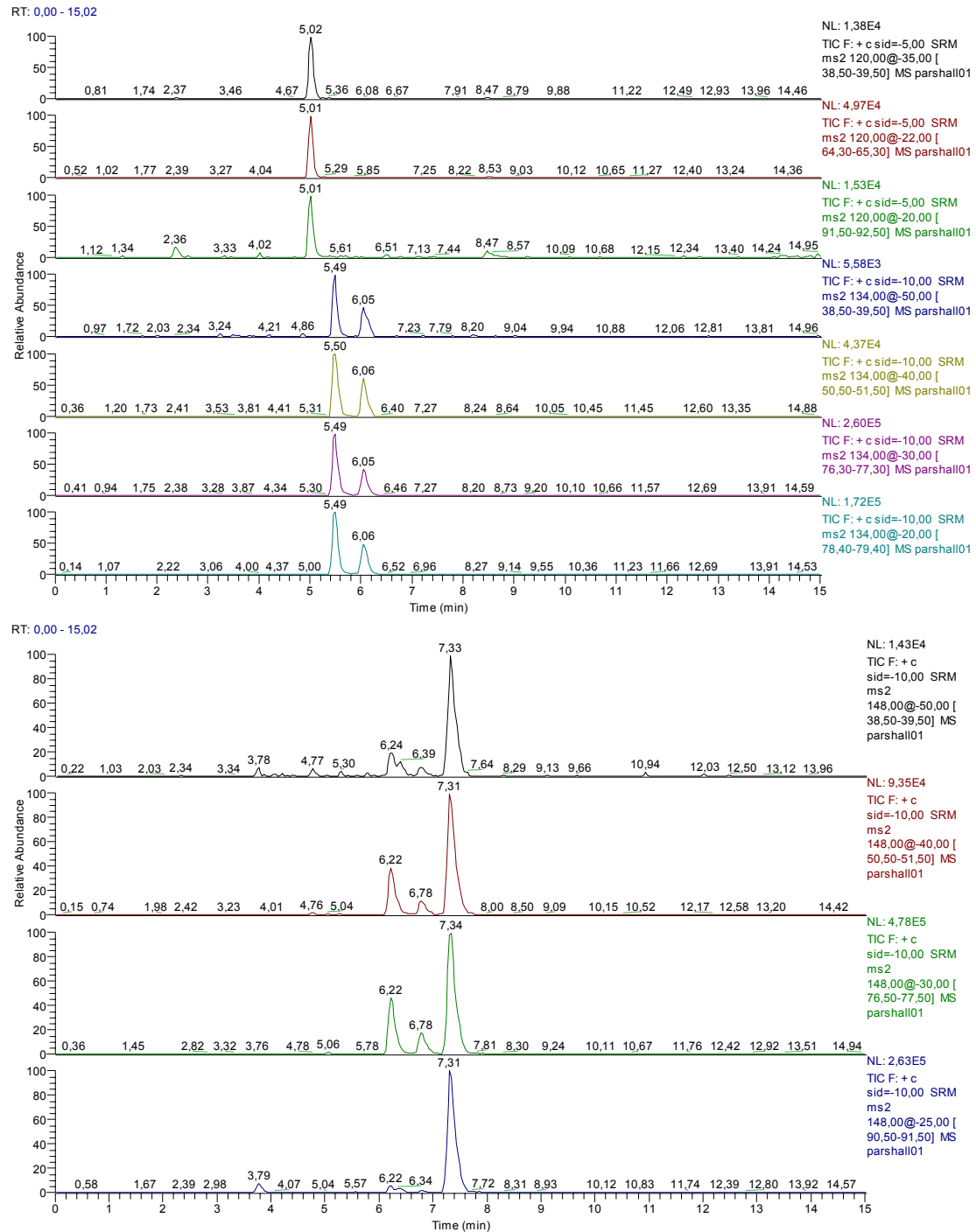
Α2. Δειγματοληψία Νο 2



Χρωματογράφημα 7.6: Είσοδος Β' Δεξαμενής Καθίζησης (18/11/2005)

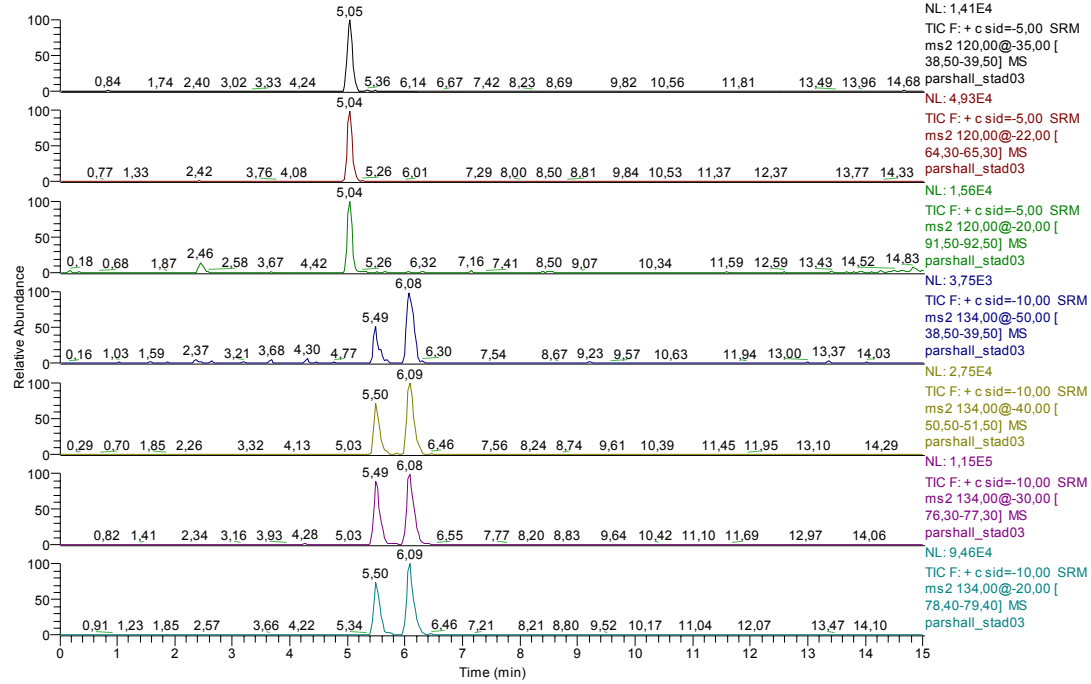


Χρωματογράφημα 7.7: Είσοδος Β' Δεξαμενής Καθίζησης - Προσθήκη: 80ppb (18/11/2005)

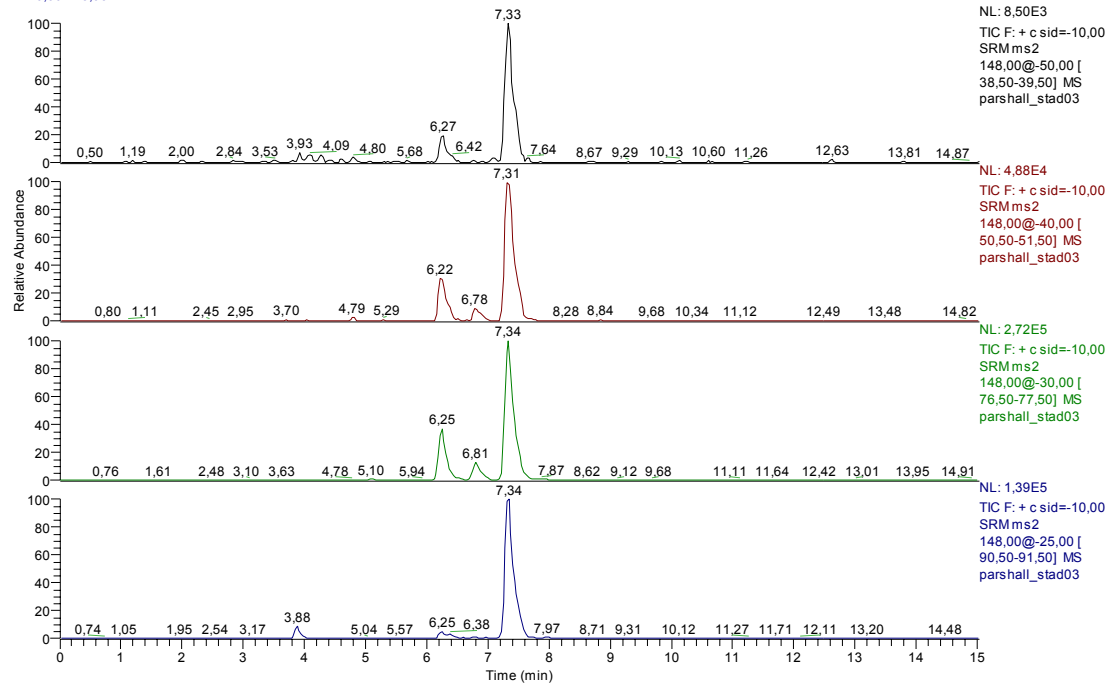


Χρωματογράφημα 7.8: Δίαισλος Parshall (18/11/2005)

RT: 0,00 - 15,03

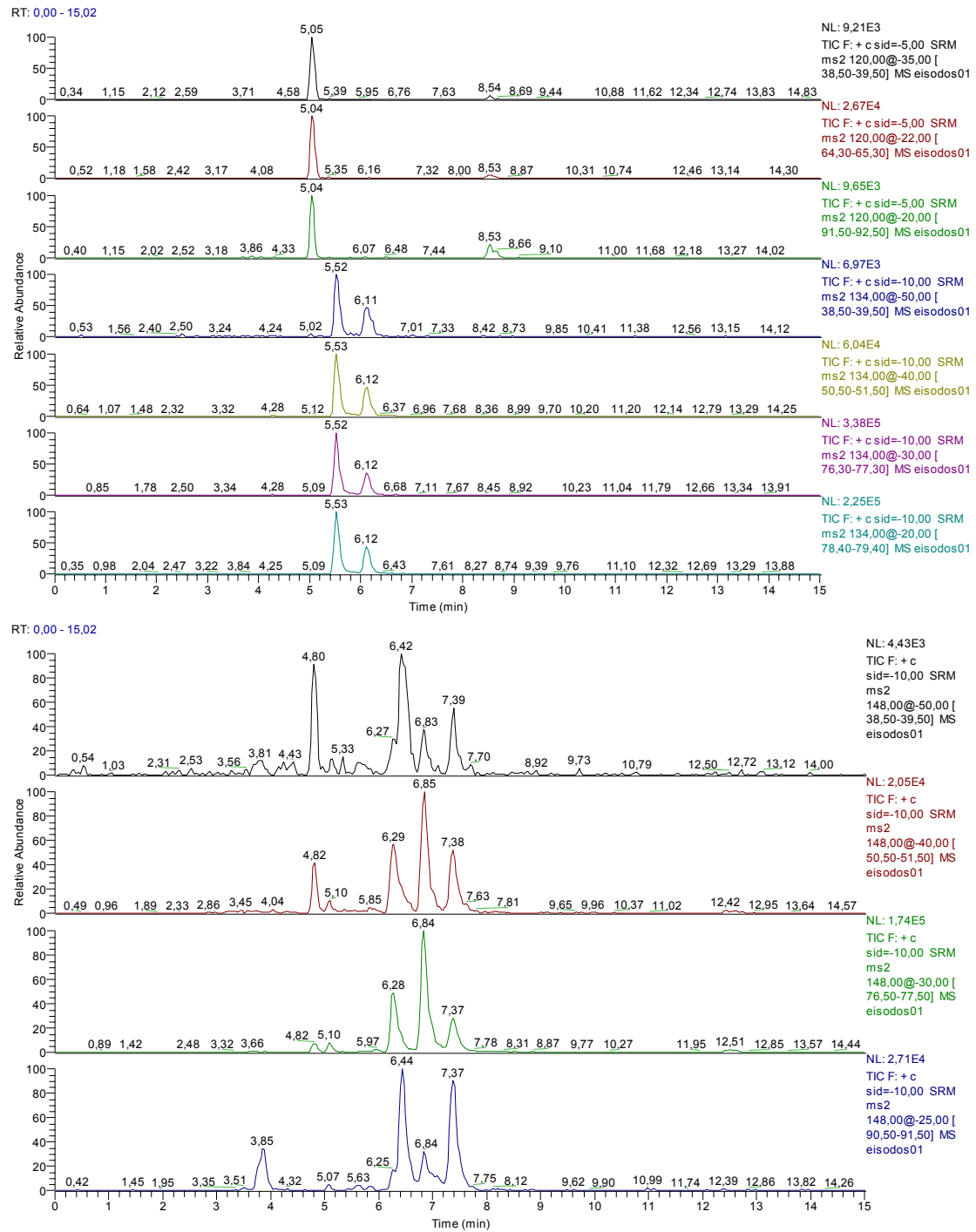


RT: 0,00 - 15,03

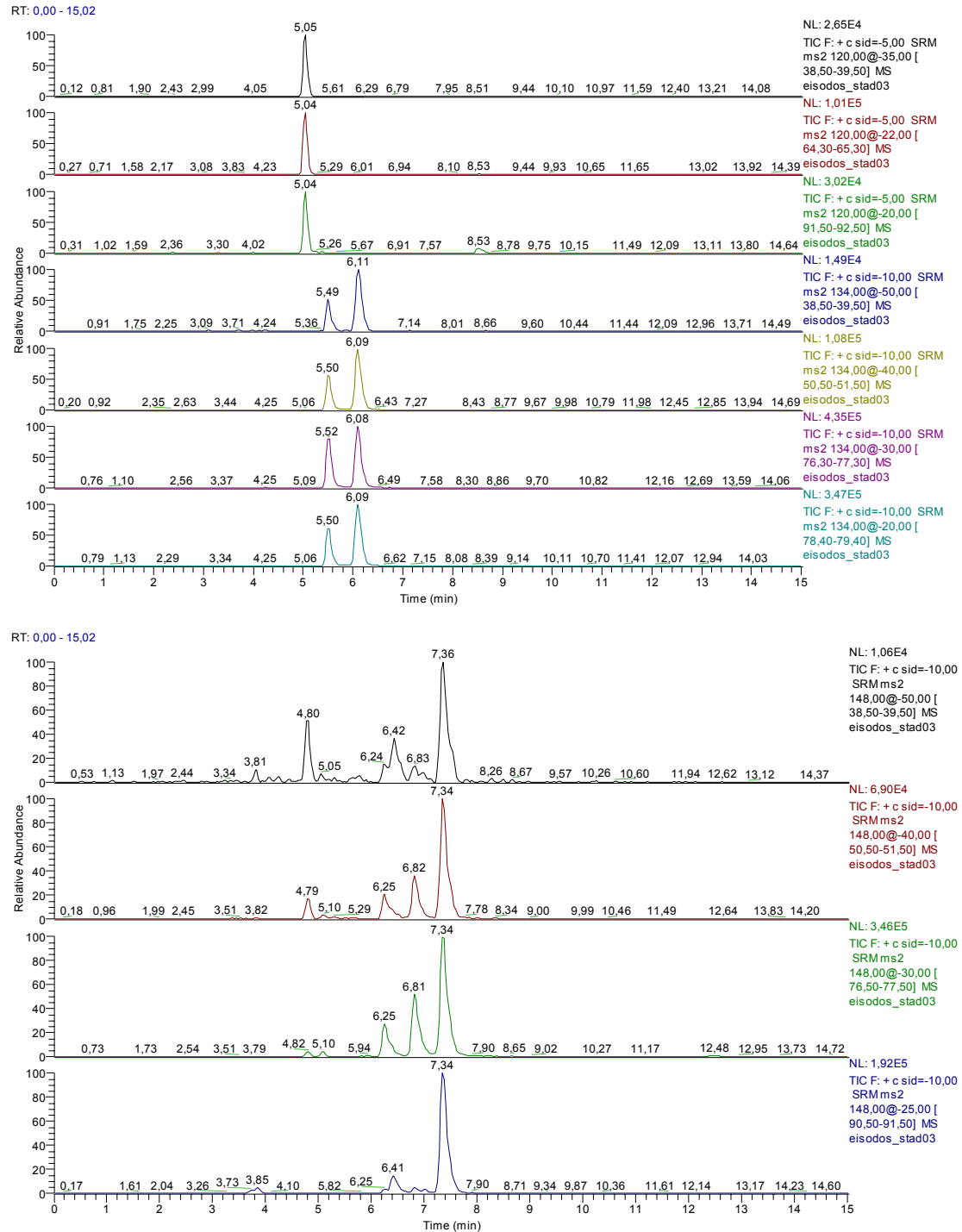


Χρωματογράφημα 7.9: Διάλυος Parshall - Προσθήκη: 80ppb (18/11/2005)

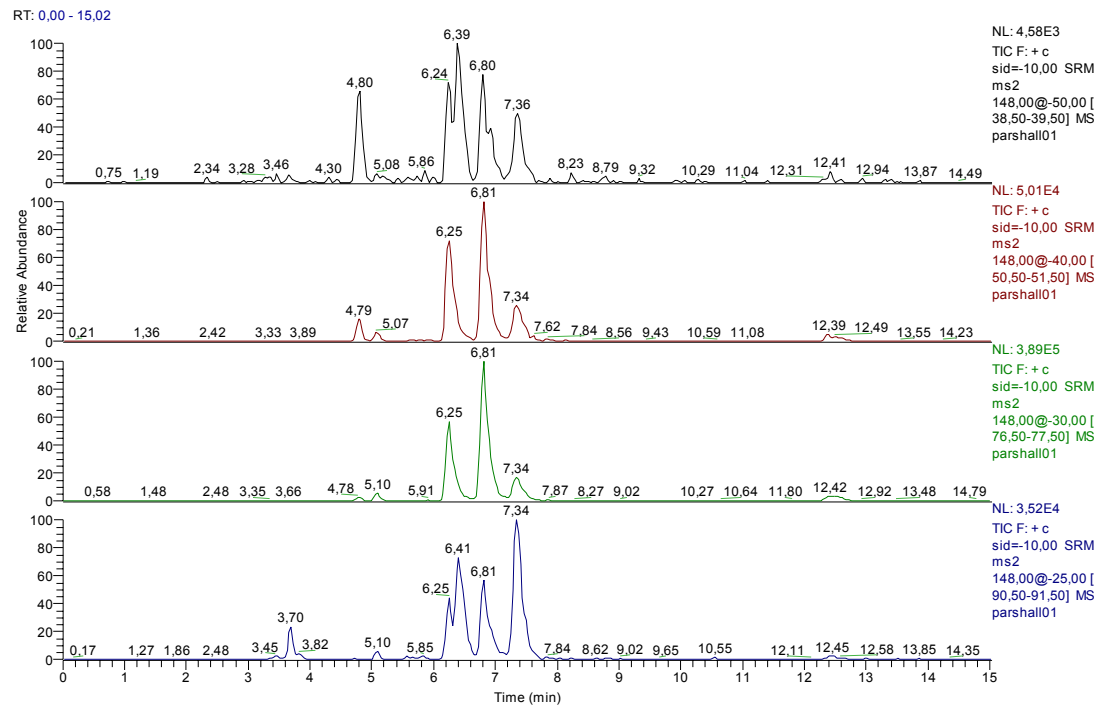
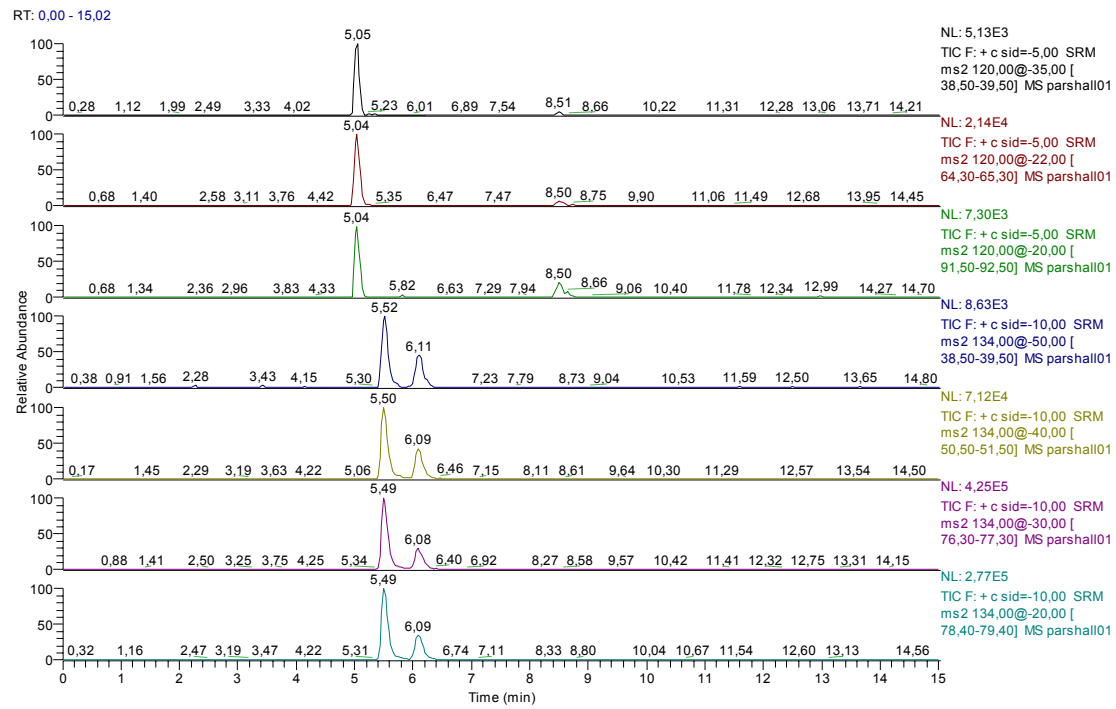
Α3. Δειγματοληψία Νο 3



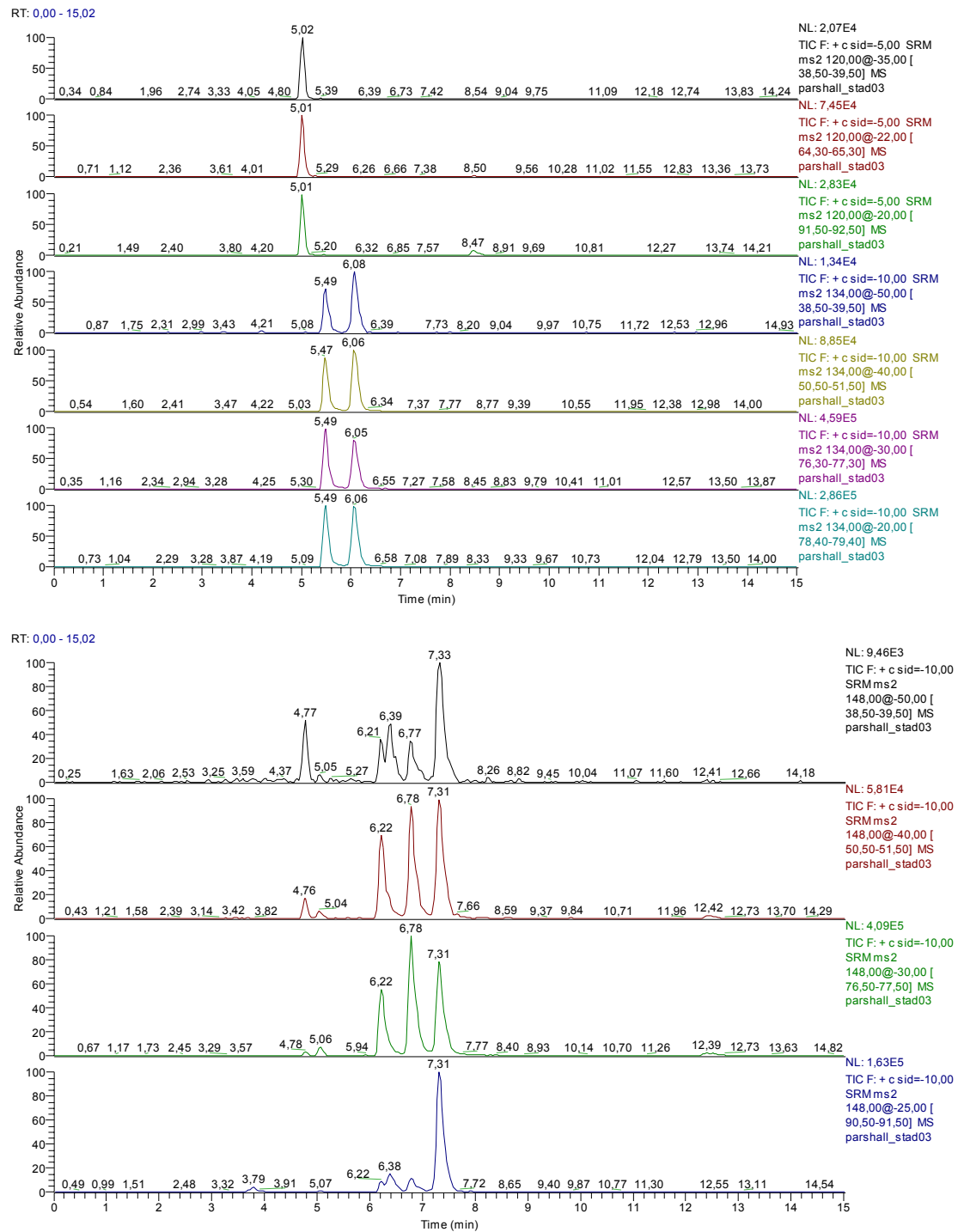
Χρωματογράφημα 7.10: Είσοδος (14/12/2005)



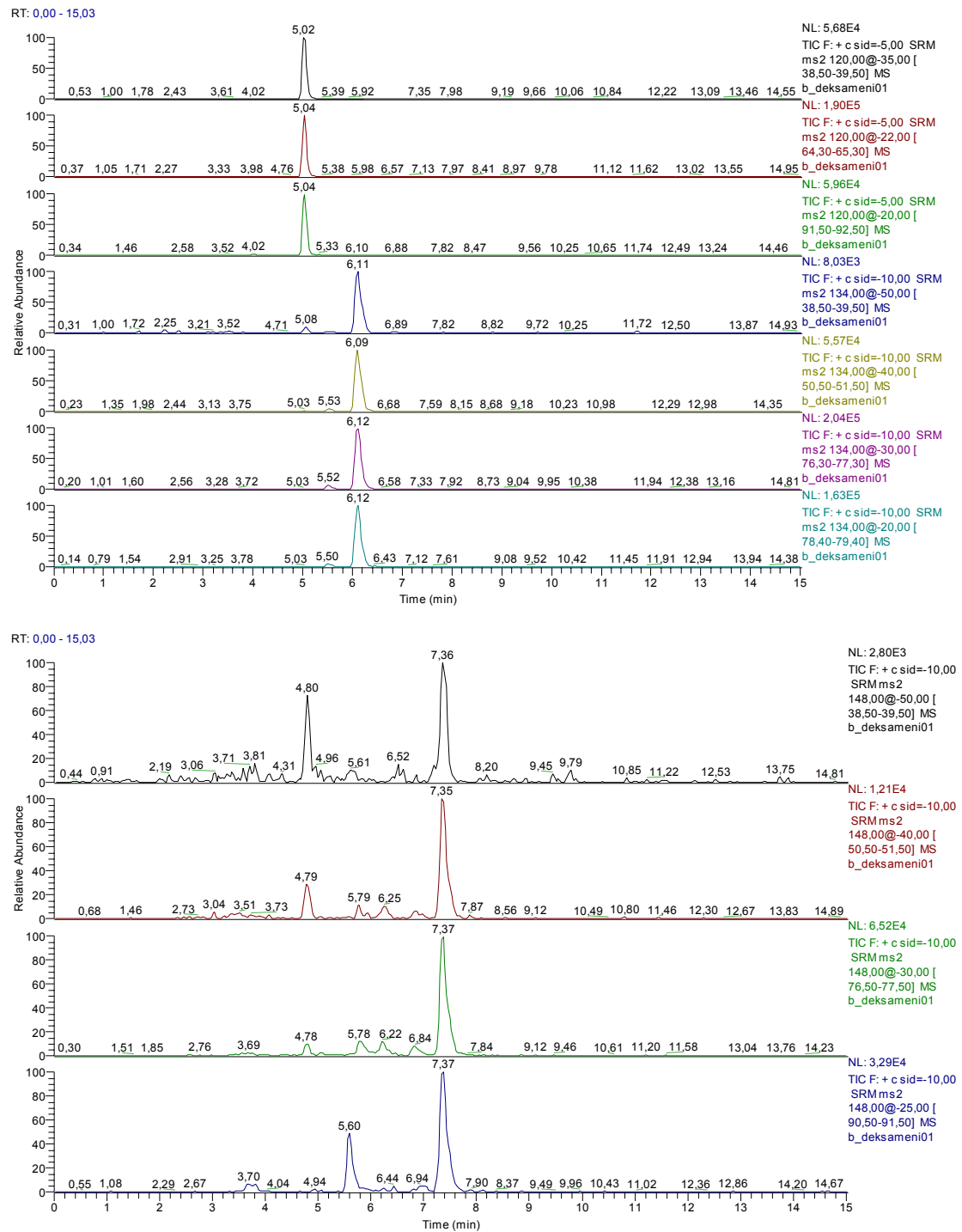
Χρωματογράφημα 7.11: Είσοδος - Προσθήκη: 80ppb (14/12/2005)



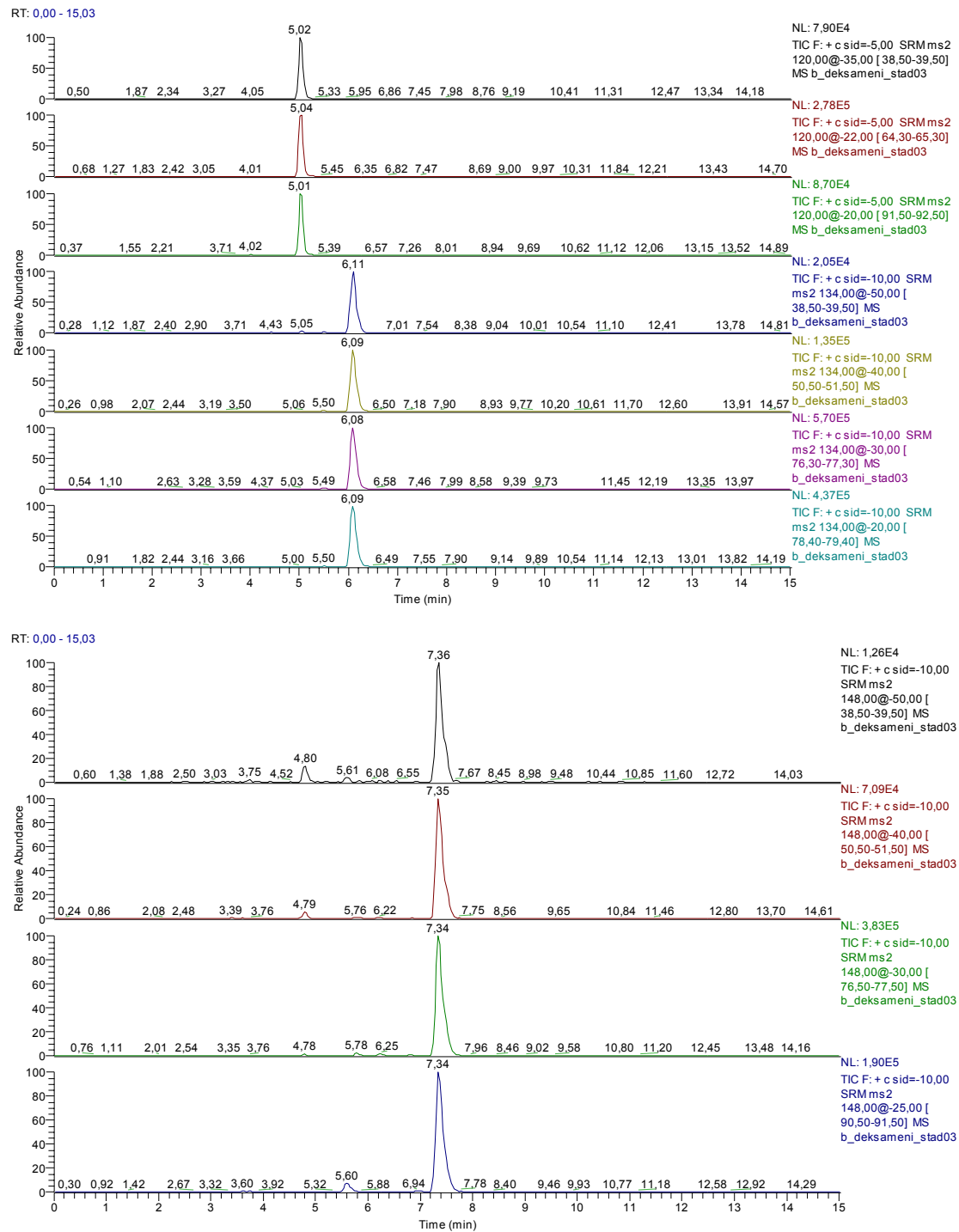
Χρωματογράφημα 7.12: Δίαισλος Parshall (14/12/2005)



Χρωματογράφημα 7.13: Διάλυτος Parshall - Προσθήκη: 80ppb (14/12/2005)



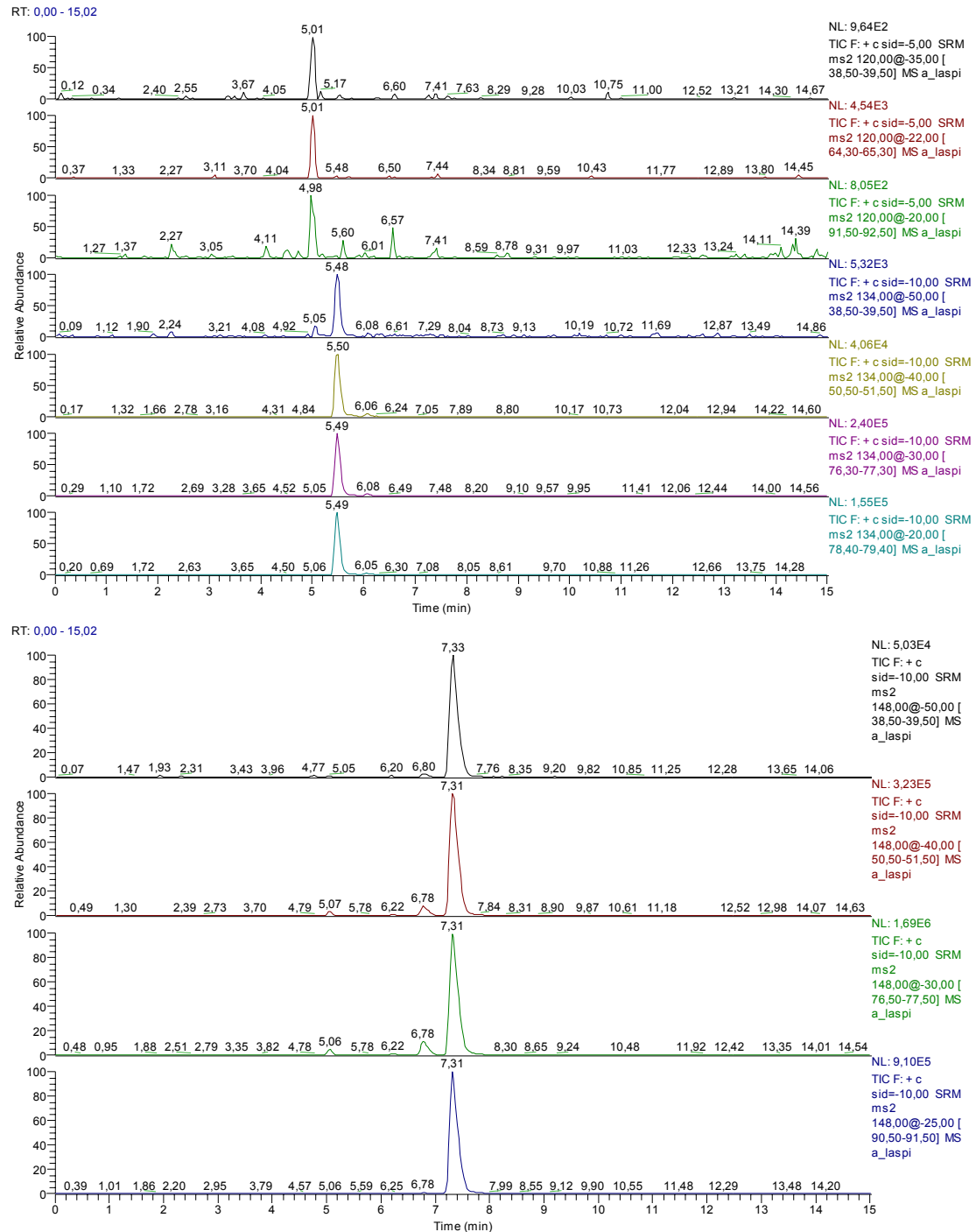
Χρωματογράφημα 7.14: Είσοδος Β' Δεξαμενής Καθίζησης (14/12/2005)



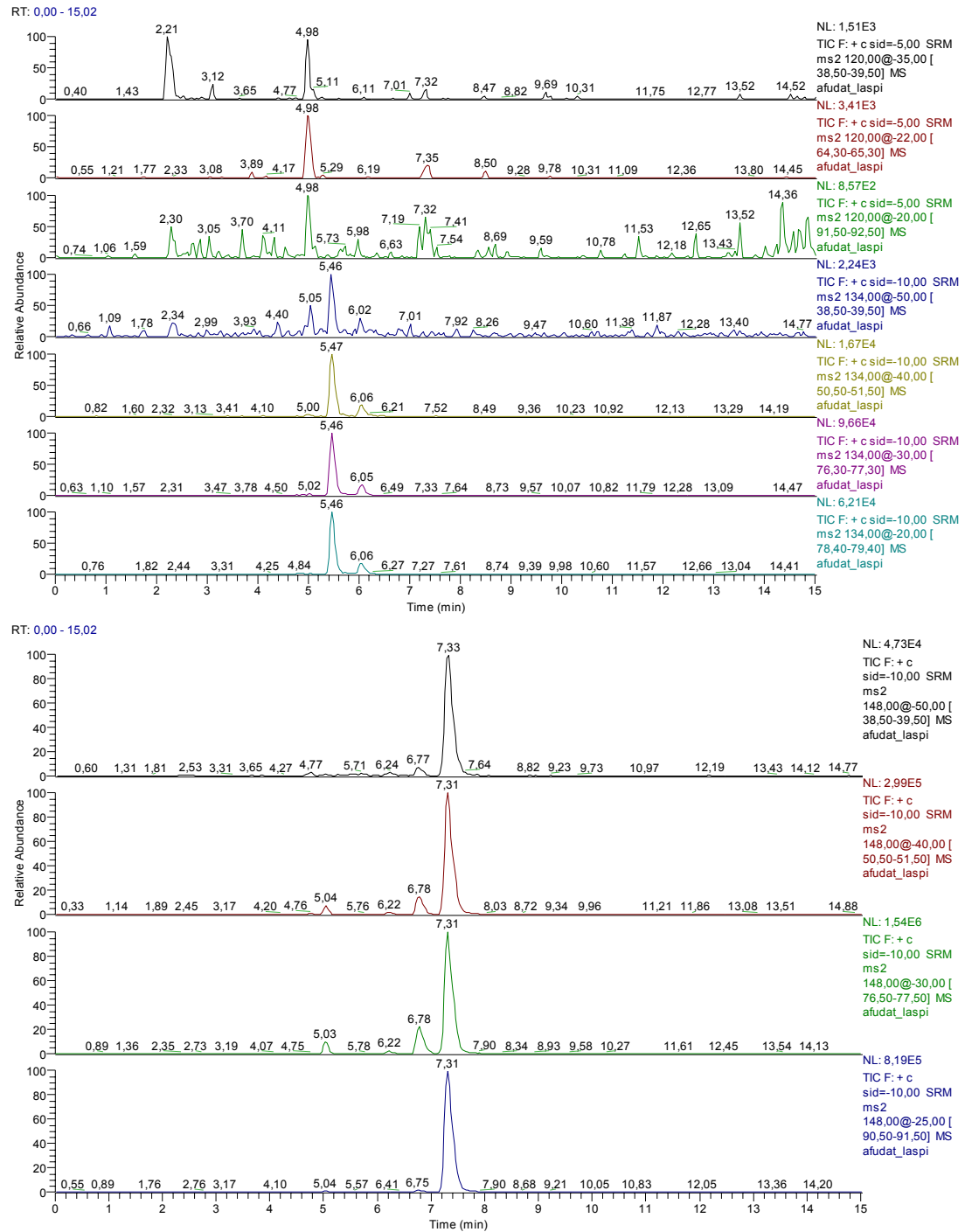
Χρωματογράφημα 7.15: Είσοδος Β' Δεξαμενής Καθίζησης - Προσθήκη: 80ppb (14/12/2005)

Β. Σωματιδιακή Φάση

Β1. Δειγματοληψία Νο 1

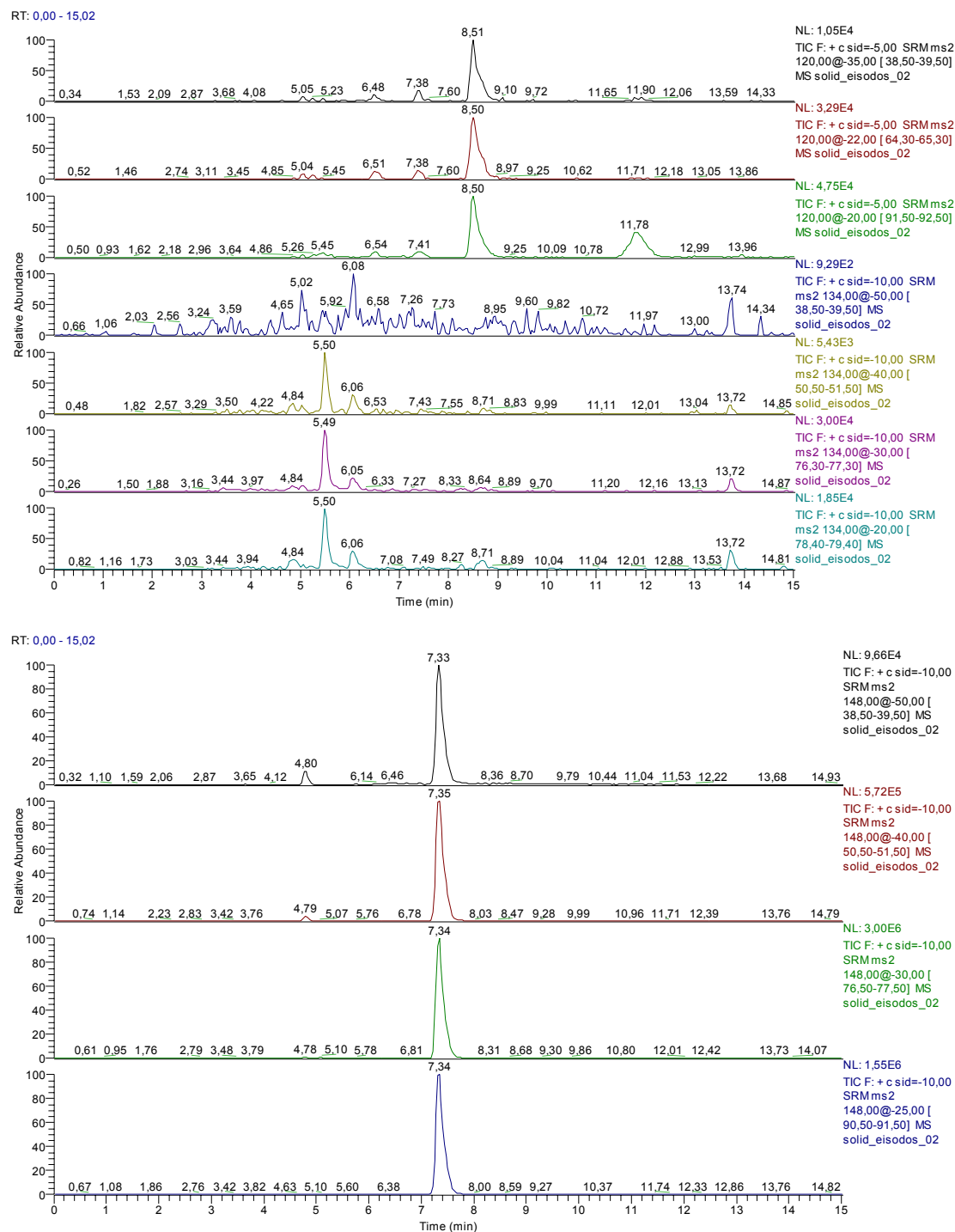


Χρωματογράφημα 7.16: Α' Λάσπη (10/06/2005)



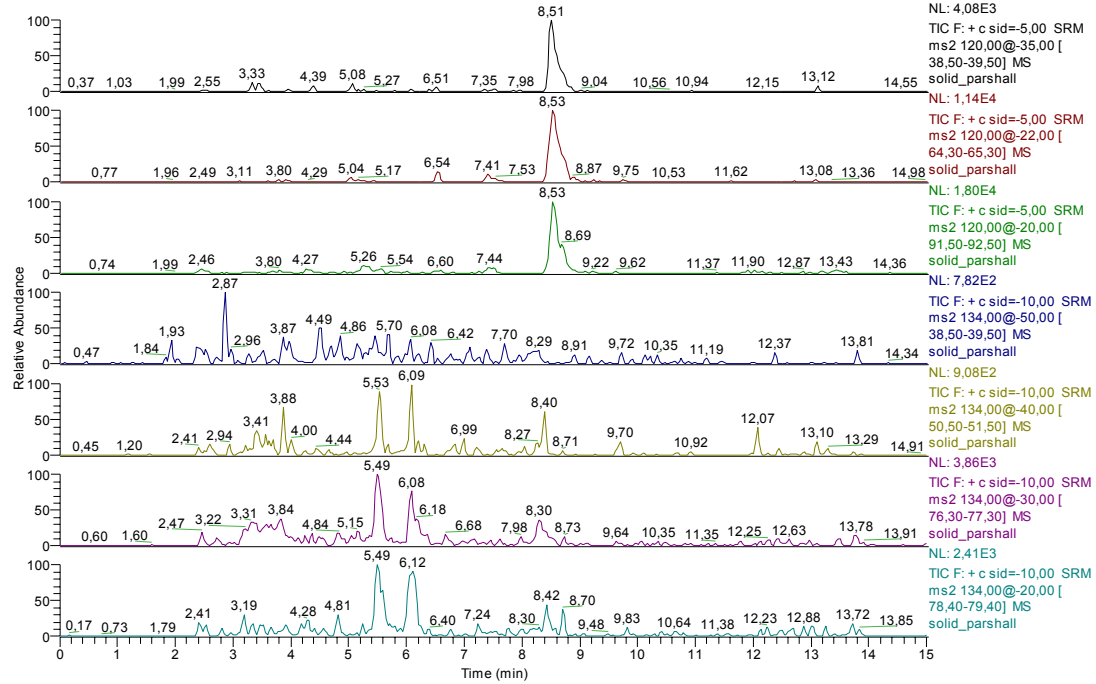
Χρωματογράφημα 7.18: Αφυδατωμένη Λάσπη (10/06/2005)

B2. Δειγματοληψία Νο 2

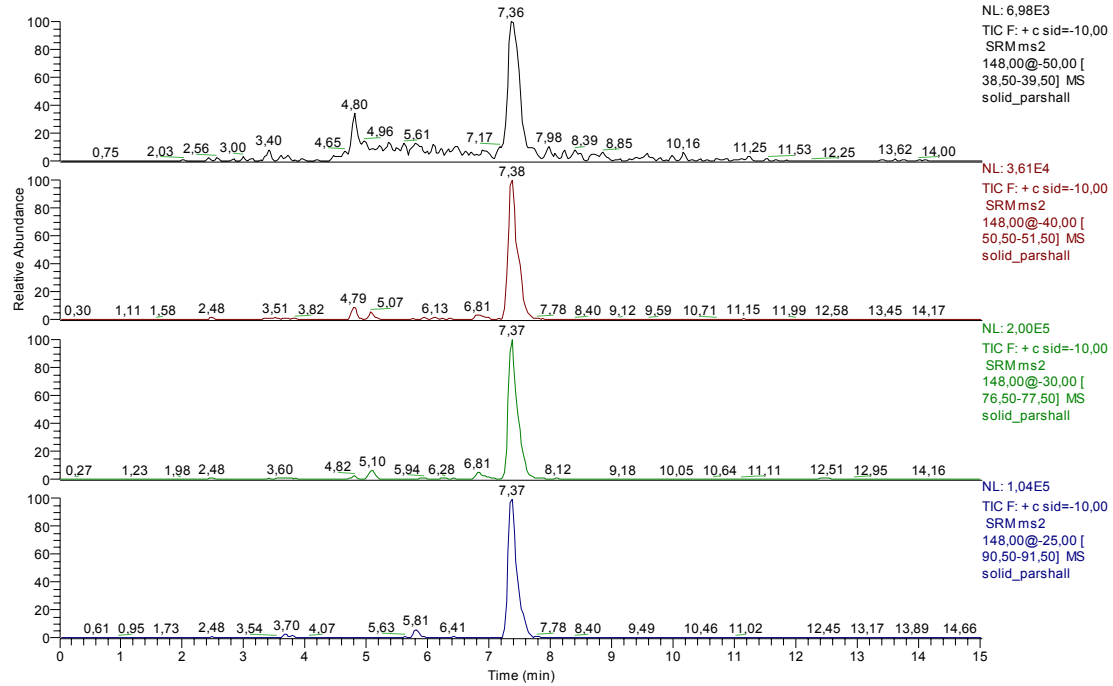


Χρωματογράφημα 7.19: Είσοδος - Σωματιδιακή Φάση (21/11/2005)

RT: 0,00 - 15,02

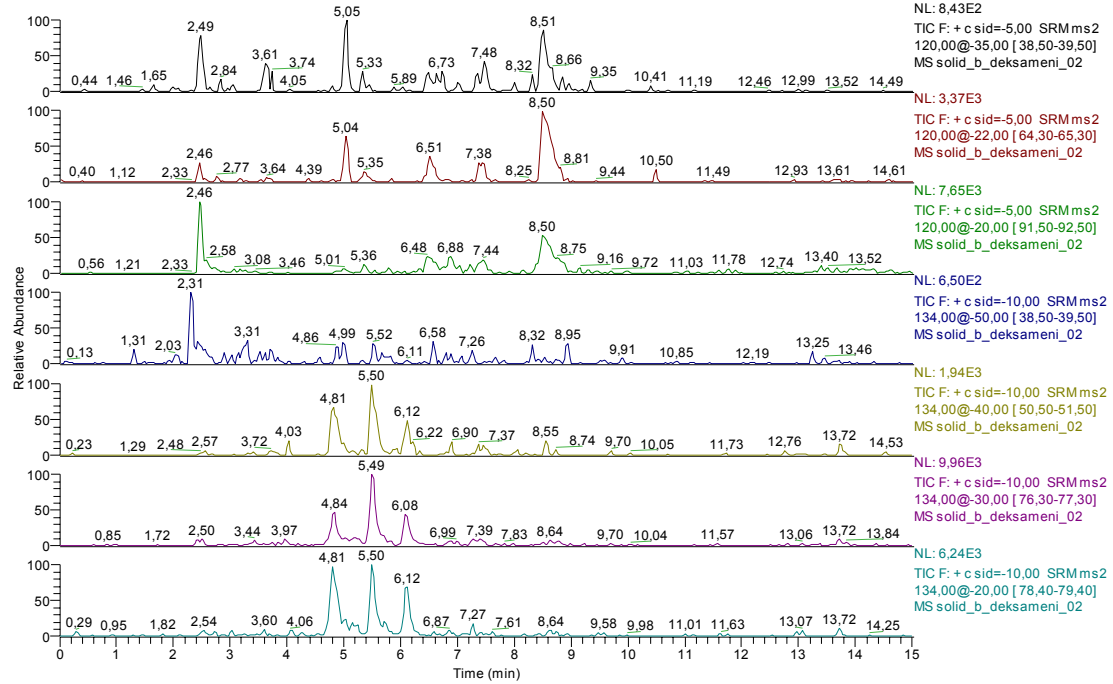


RT: 0,00 - 15,02

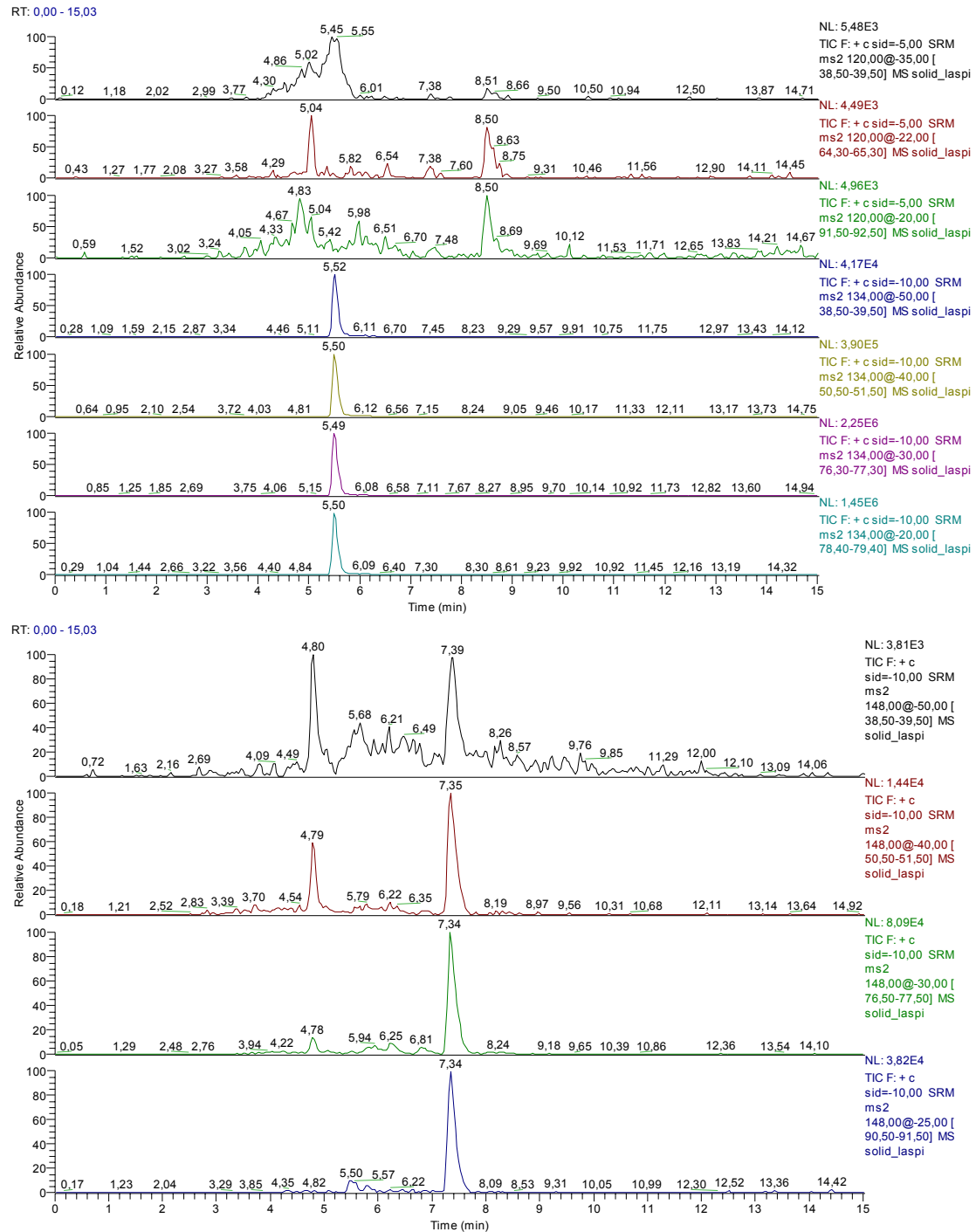


Χρωματογράφημα 7.20: Δίαισλος Parshall - Σωματιδιακή Φάση (21/11/2005)

RT: 0,00 - 15,02

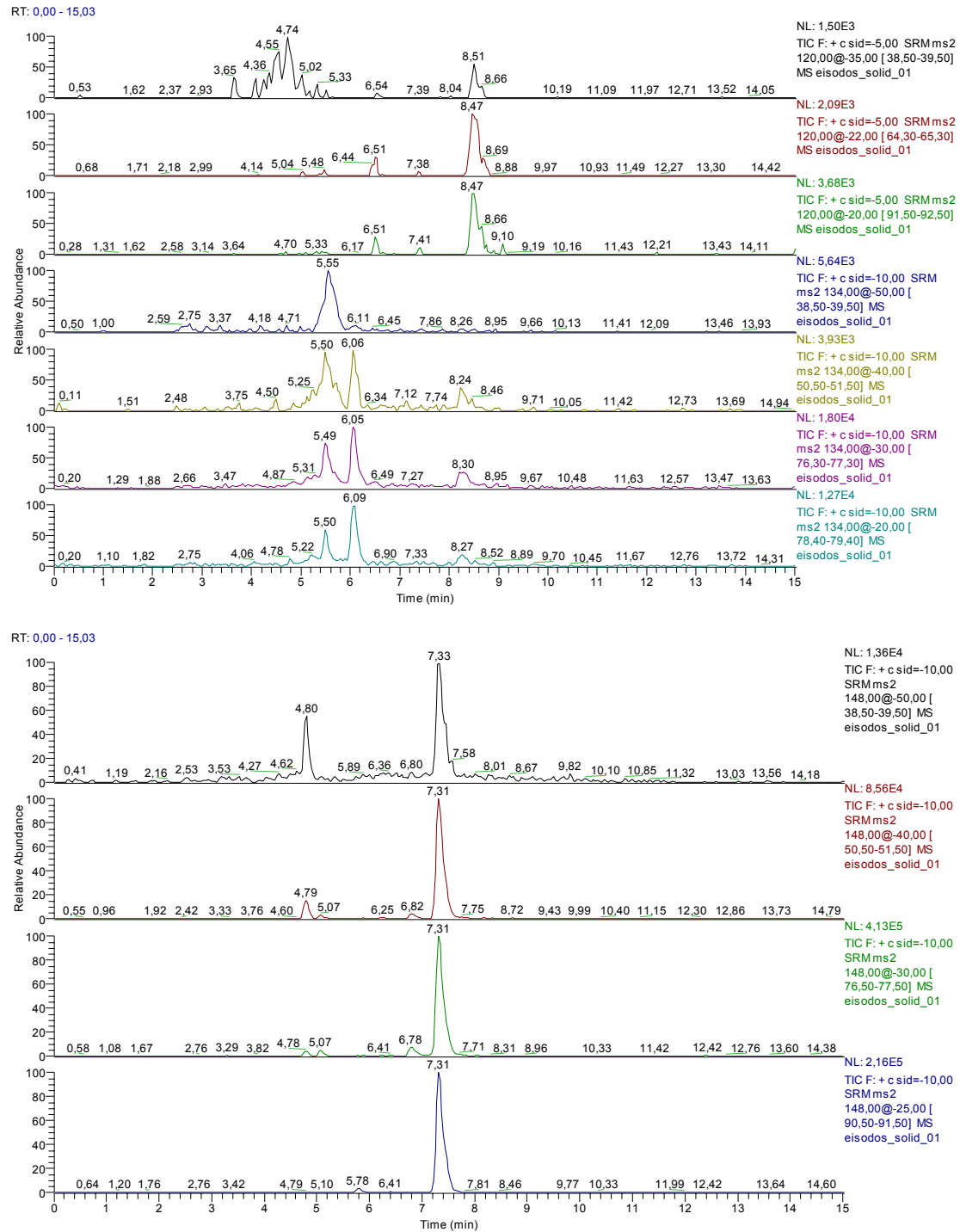


Χρωματογράφημα 7.21: Είσοδος Β' Δεξαμενής Καθίζησης - Σωματιδιακή Φάση (21/11/2005)

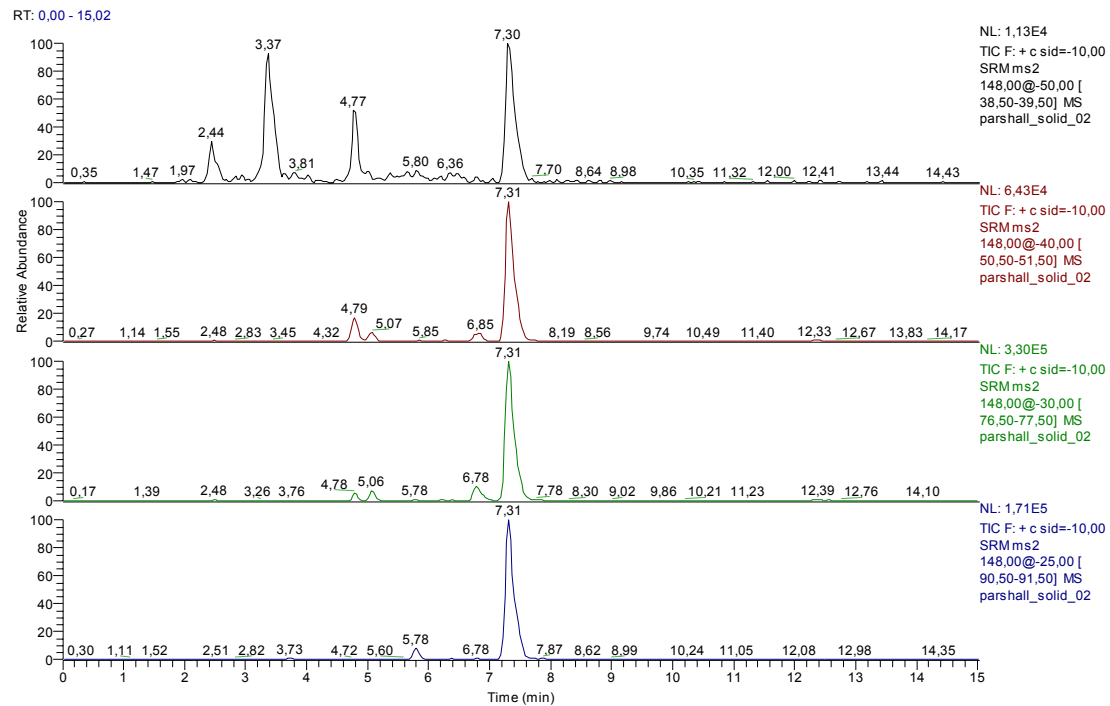
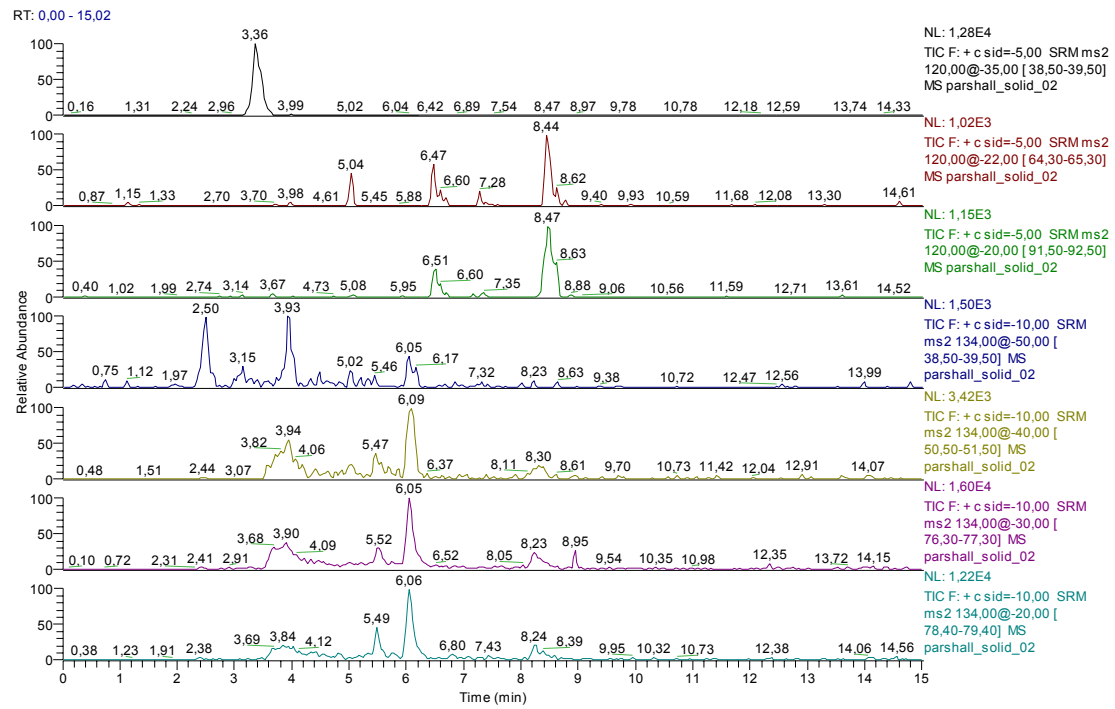


Χρωματογράφημα 7.22: Αφυδατωμένη Λάσπη - Σωματιδιακή Φάση (21/11/2005)

B3. Δειγματοληψία Νο 3

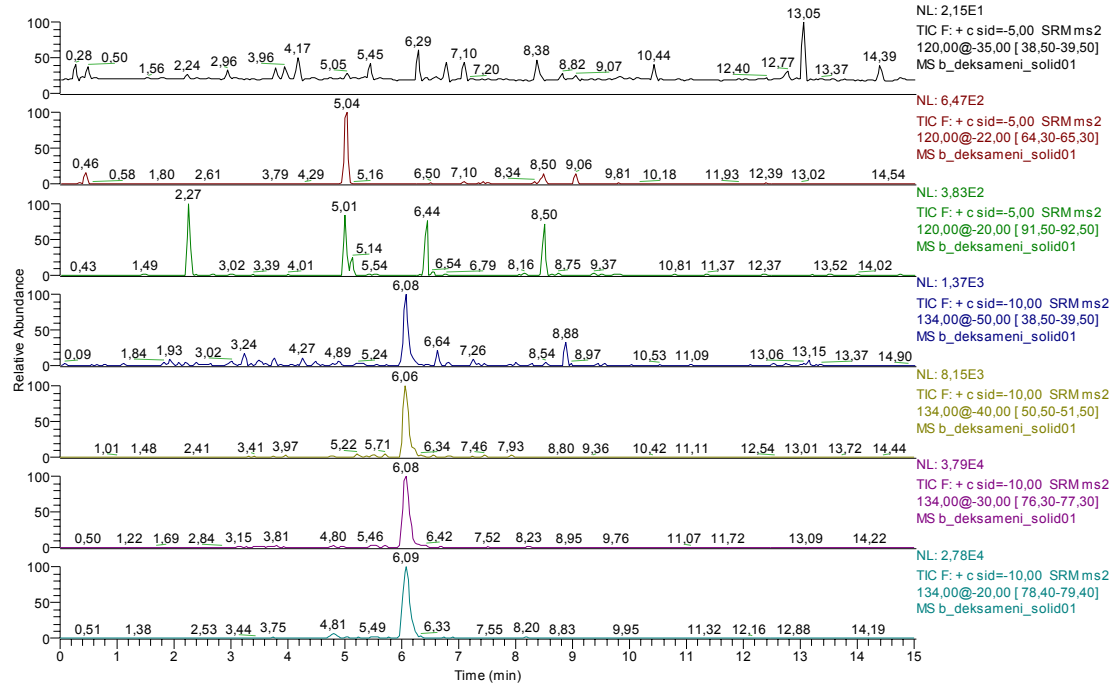


Χρωματογράφημα 7.23: Είσοδος - Σωματιδιακή Φάση (13/12/2005)

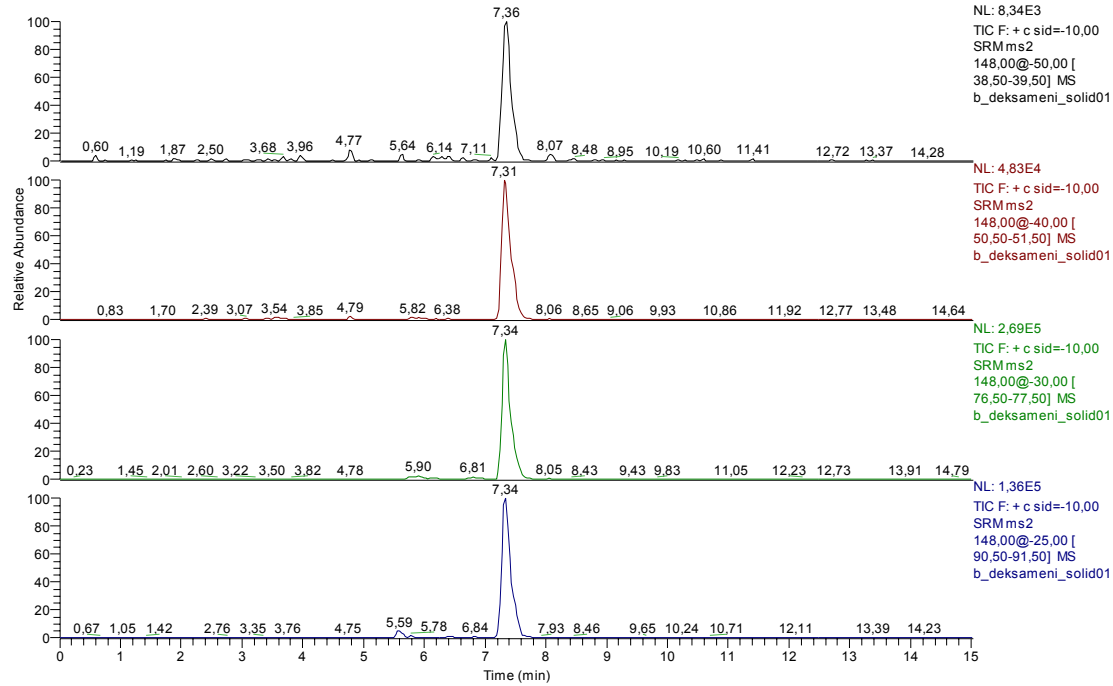


Χρωματογράφημα 7.24: Διαλυός Parshall - Σωματιδιακή Φάση (13/12/2005)

RT: 0,00 - 15,02

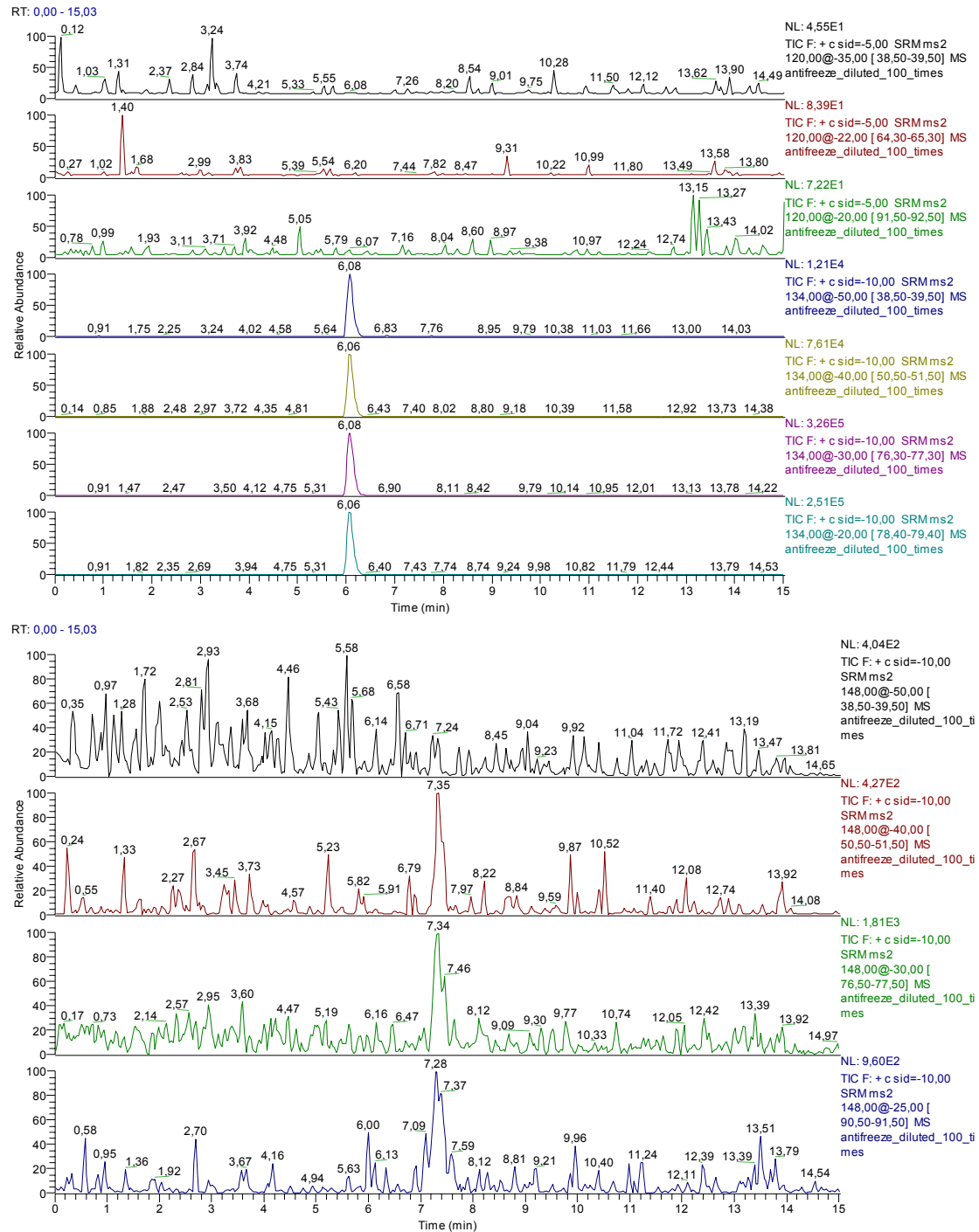


RT: 0,00 - 15,02



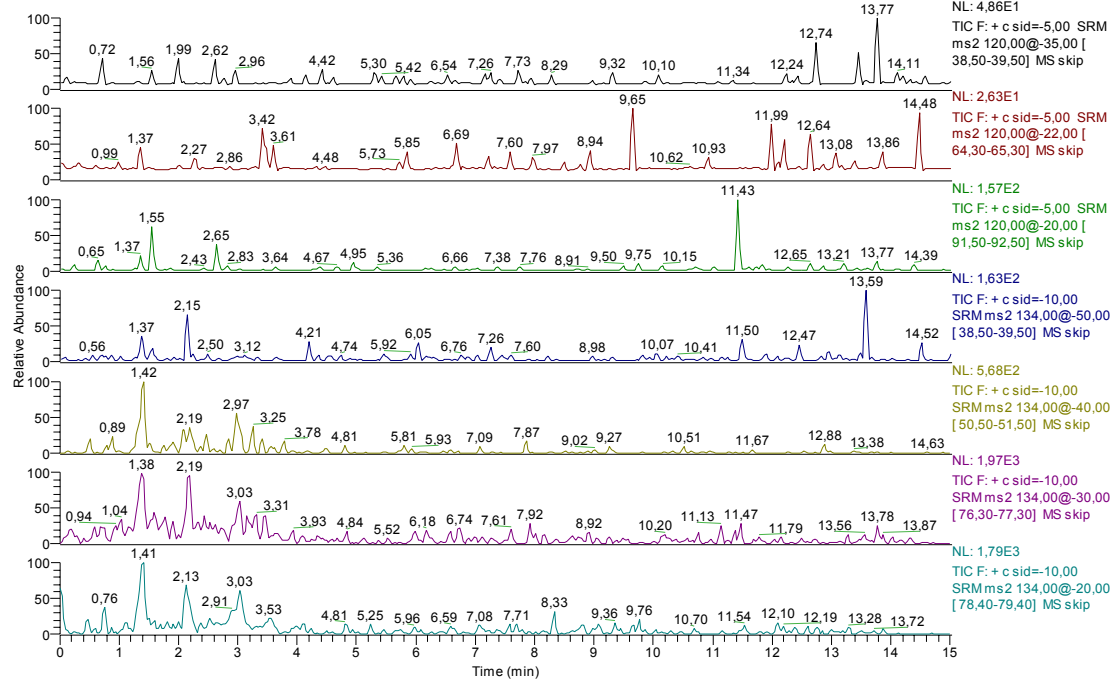
Χρωματογράφημα 7.25: Είσοδος Β' Δεξαμενής Καθίζησης - Σωματιδιακή Φάση (13/12/2005)

Γ. Εμπορικά προϊόντα

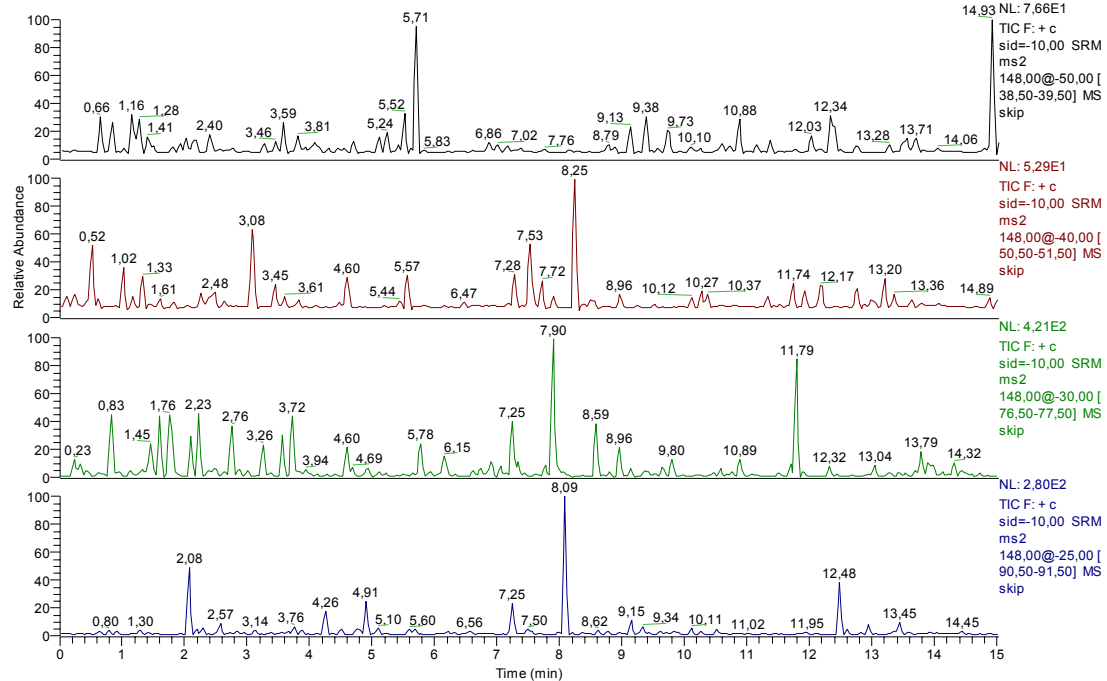


Χρωματογράφημα 7.26: Αντιψυκτικό (αραιωμένο 100 φορές) – Εμπορικά Προϊόντα
(13/12/2005)

RT: 0,00 - 15,02

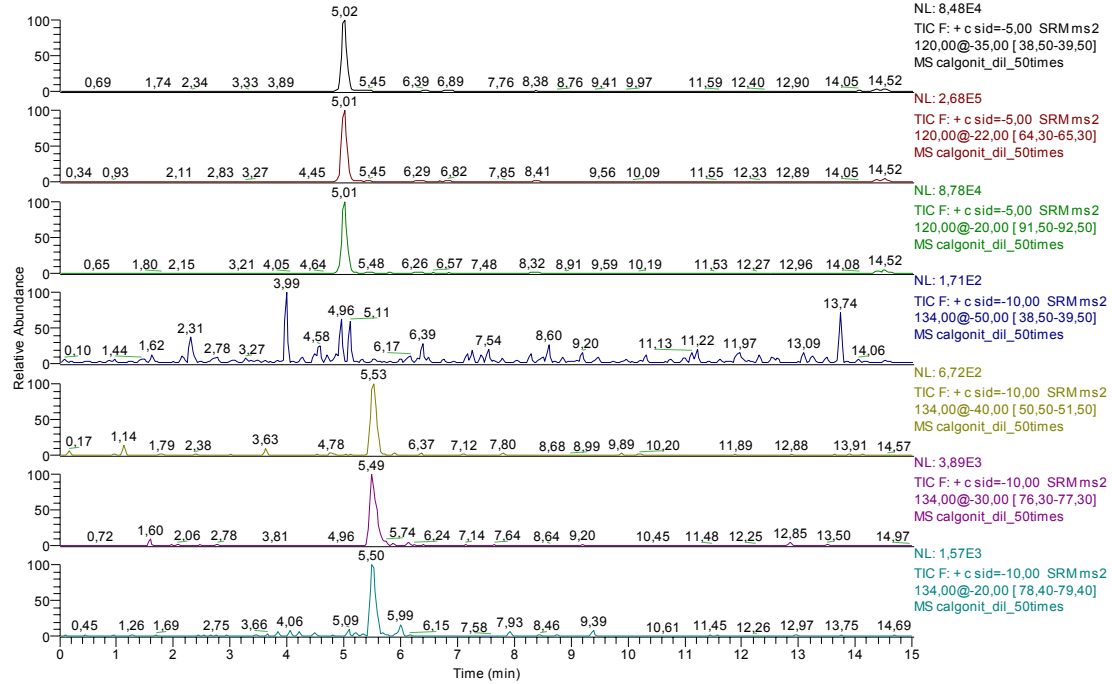


RT: 0,00 - 15,02

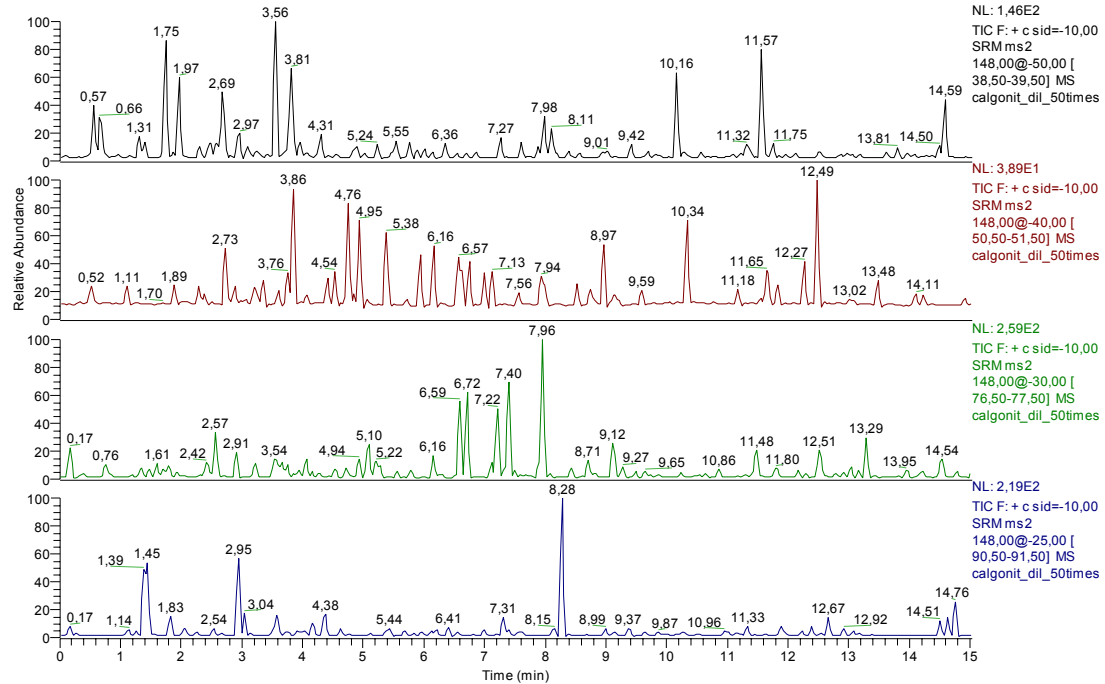


Χρωματογράφημα 7.27: Skir - Εμπορικά Προϊόντα (02/06/2005)

RT: 0,00 - 15,03



RT: 0,00 - 15,03



Χρωματογράφημα 7.28: Calgonit (αραιωμένο 50 φορές): Απορρυπαντικό πλυντηρίου πιάτων - Εμπορικά Προϊόντα (19/11/2005)

7.2. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 - Πίνακες ελέγχου ύπαρξης παρεμπόδισης μήτρας

Πίνακας 7.1: Ποσοτικός προσδιορισμός τριαζολών και έλεγχος παρεμπόδισης μήτρας σε υγρό δείγμα διαλύου Parshall από τον Σταθμό Βιολογικής Επεξεργασίας Λυμάτων (18/11/2005)

	C (ppb)	REACTIONS										
		1H-BZT (area)			tolyl-TZL (area)				5,6-Dimethyl-1H-Benzotriazole			
		fragm1 (39)	fragm2 (65)	fragm3 (92)	fragm4 (39)	fragm5 (51)	fragm6 (77)	fragm7 (79)	fragm8 (39)	fragm9 (51)	fragm10 (77)	fragm11 (91)
blank (water+MeOH)	0	7,46	116	0	39	622	925	957	736	29	97	11
calibration2	20	65898	192399	60238	13130	107623	470878	352806	13647	89450	521597	271916
calibration3	40	125063	430148	137494	27854	186657	821439	637035	21420	158804	871516	463410
calibration4	80	243371	863196	267835	60415	444536	2E+06	1497088	43664	320310	1715584	924714
calibration5	160	432880	1486138	490286	115651	810370	3E+06	2731513	124666	784848	4175876	2149121
sample (without spike)	0	154453	525519	167159	26952	220002	954444	751301	156898	1059901	5315372	2950326
spike1	20	192613	721725	227411	43300	314708	1E+06	1067614	178943	1147154	5960178	3286296
spike2	40	239255	829557	256889	52009	383239	2E+06	1272601	167021	1032867	5450745	3061100
spike3	80	359686	1235152	428413	70017	556176	2E+06	1753868	190623	1266061	6603404	3418148
spike4	160	494396	1779996	537047	131722	962766	4E+06	3243948	244010	1719987	8839732	4739141
C(st.ad.)_fragments		72,16	69,6159	76,128	41,815	45,4545	45,54	45,1251	267,194	215,417	214,712	258,71
ΑΡΑΙΩΣΗ(322-->350)=1,087		78,438	75,672	82,751	45,453	49,409	49,502	49,051	290,440	234,158	233,392	281,218
C(cal.curve)_sample		52,937	52,632	52,194	37,461	42,415	41,954	38,778	209,556	220,777	208,334	223,232
slope1 (st.ad.)		2179,8	7857	2375,6	636,45	4621,7	19877	15390	562,4	4448,6	23287	11596
slope2 (cal.curve)		2688,6	9348,2	3076,6	730,55	5115,8	22103	17261	783,03	4933,8	26202	13483
(slope2-slope1)		508,8	1491,2	701	94,1	494,1	2226	1871	220,63	485,2	2915	1887
(slope1-slope2)*100%		18,9	16,0	22,8	12,9	9,7	10,1	10,8	28,2	9,8	11,1	14,0

Πίνακας 7.2: Ποσοτικός προσδιορισμός τριαζολών και έλεγχος παρεμπόδισης μήτρας σε υγρό δείγμα Β' Δεξαμενής από τον Σταθμό Βιολογικής Επεξεργασίας Λυμάτων (18/11/2005)

	C (ppb)	REACTIONS										
		1H-BZT (area)			tolyl-TZL (area)				5,6-Dimethyl-1H-Benzotriazole			
		fragm1 (39)	fragm2 (65)	fragm3 (92)	fragm4 (39)	fragm5 (51)	fragm6 (77)	fragm7 (79)	fragm8 (39)	fragm9 (51)	fragm10 (77)	fragm11 (91)
blank (water+MeOH)	0	31,58	42,26	0	71,19	46,7	60,88	317	9,9	95,08	2286	0
calibration1	20	66226	226592	77640	24719	185168	830101	620883	28363	169487	882288	464951
calibration2	80	285005	887180	302961	99469	734844	4237975	2E+06	99648	653878	3376232	1797014
calibration3	160	543990	1827047	584644	198440	1E+06	6091795	5E+06	183706	1183129	6236304	3254529
sample (without spike)	0	421119	1424748	476236	44821	322224	1423169	1E+06	284144	1790028	9388805	5117609
spike1	20	478512	1516284	475840	54866	423647	1851335	1E+06	284626	1846746	9637045	5159524
spike2	80	553187	1865071	604901	108734	732664	3131766	2E+06	339362	2113753	1,1E+07	6040158
spike3	160	682133	2327171	771485	170959	1E+06	4689882	4E+06	378697	2469280	1,3E+07	6869039
C(st.ad.)_fragments		276,94	175,707	237,36	52,705	67,822	48,9428	62,426	444,385	463,843	414,422	434,556
ΑΡΑΙΩΣΗ(322-->350)=1,087		301,034	190,993	258	57,290	73,723	53,201	67,857	483,047	504,198	450,477	472,362
C(cal.curve)_sample		133,455	136,362	141,3	39,241	38,543	33,151	39,616	267,572	260,367	259,798	270,731
slope1 (st.ad.)		1560,9	5691,3	1926,9	805,79	4846,1	20432	16019	631,56	4311,8	21717	11506
slope2 (cal.curve)		3417,5	11399	3651,1	1240,4	8883	39028	29658	1140	7391,8	38919	20336
(slope2-slope1)		1856,6	5707,7	1724,2	434,61	4036,9	18596	13639	508,44	3080	17202	8830
(slope1-slope2)*100%		54,3	50,1	47,2	35,0	45,4	47,6	46,0	44,6	41,7	44,2	43,4

Πίνακας 7.3: Ποσοτικός προσδιορισμός τριαζολών και έλεγχος παρεμπόδισης μήτρας σε υγρό δείγμα Εισόδου από τον Σταθμό Βιολογικής Επεξεργασίας Λυμάτων (14/12/2005)

	C (ppb)	REACTIONS										
		1H-BZT (area)			tolyl-TZL (area)				5,6-Dimethyl-1H-Benzotriazole			
		fragm1 (39)	fragm2 (65)	fragm3 (92)	fragm4 (39)	fragm5 (51)	fragm6 (77)	fragm7 (79)	fragm8 (39)	fragm9 (51)	fragm10 (77)	fragm11 (91)
blank (water+MeOH)	0	0	0	0	193	0	408	611	0	0	0	0
calibration2	20	25958	91666	28343	33374	214212	960768	730527	27934	222935	1025919	569215
calibration3	40	54002	192623	61962	68828	486215	1982938	1494868	67623	462125	2298508	1220971
calibration4	80	125610	421197	136024	137590	981013	4234793	3129165	143609	868560	4664869	2333408
calibration5	160	254105	807656	231871	280314	1950557	8518403	6358065	269112	1830229	8892383	4927271
sample (without spike)	0	55432	202828	65006	36535	294652	1273944	922874	14296	96955	552561	253601
spike1	20	96329	326907	103637	56576	459315	1904397	1408933	36136	247953	1286618	641701
spike2	40	132392	456892	147376	90872	600518	2409155	1925882	52377	406988	2059256	988906
spike3	80	173019	681800	212353	136679	1017140	4160884	3146676	109621	696797	3600535	2065947
spike4	160	311351	1055045	342282	238677	1591879	6704546	5051137	182371	1178132	6063800	3155213
C(st.ad.)_fragments		39,291344	42,8250241	41,3798323	28,048013	36,473201	28,939372	35,3994715	13,9732059	17,9229024	18,54104294	16,7687321
ΑΡΑΙΩΣΗ(322->350)=1,087		42,710	46,551	44,980	30,488	39,646	31,457	38,479	15,189	19,482	20,154	18,228
C(cal.curve)_sample		40,356	43,905	45,738	23,309	26,913	27,295	27,512	9,554	9,833	10,408	10,118
slope1 (st.ad.)		1548	5297,3	1717,6	1270,5	8216,8	34555	26112	1067,4	6742,1	34537	18511
slope2 (cal.curve)		1612,8	5104,4	1470,9	1753,8	12274	53651	40404	1707,1	11390	55971	30763
(slope2-slope1)		64,8	-192,9	-246,7	483,3	4057,2	19096	14292	639,7	4647,9	21434	12252
(slope1-slope2)*100%		4,0	-3,8	-16,8	27,6	33,1	35,6	35,4	37,5	40,8	38,3	39,8

Πίνακας 7.4: Ποσοτικός προσδιορισμός τριαζολών και έλεγχος παρεμπόδισης μήτρας σε υγρό δείγμα διαλύου Parshall από τον Σταθμό Βιολογικής Επεξεργασίας Λυμάτων (14/12/2005)

	C (ppb)	REACTIONS										
		1H-BZT (area)			tolyl-TZL (area)				5,6-Dimethyl-1H-Benzotriazole			
		fragm1 (39)	fragm2 (65)	fragm3 (92)	fragm4 (39)	fragm5 (51)	fragm6 (77)	fragm7 (79)	fragm8 (39)	fragm9 (51)	fragm10 (77)	fragm11 (91)
blank (water+MeOH)	0	0	0	0	193	0	408	611	0	0	0	0
calibration2	20	25958	91666	28343	33374	214212	960768	730527	27934	222935	1025919	569215
calibration3	40	54002	192623	61962	68828	486215	1982938	1494868	67623	462125	2298508	1220971
calibration4	80	125610	421197	136024	137590	981013	4234793	3129165	143609	868560	4664869	2333408
calibration5	160	254105	807656	231871	280314	1950557	8518403	6358065	269112	1830229	8892383	4927271
sample (without spike)	0	36909	132843	42247	43962	342091	1548140	1139145	23946	153807	835100	373226
spike1	20	70833	252585	75594	78068	505857	2044276	1606467	45103	277406	1491734	688460
spike2	40	85214	341414	98248	90073	592993	2501860	1823323	63838	410225	1923492	950992
spike3	80	136015	500719	175460	127008	866711	3541156	2822701	102560	615140	3367610	1667729
spike4	160	237548	775353	249328	209165	1416912	5902886	4471253	179637	1101416	5779310	3172582
C(st.ad.)_fragments		31,916119	42,3074958	38,0380909	50,38151	52,010556	36,662267	47,83087	25,709802	27,1593097	26,2532432	17,8578164
ΑΡΑΙΩΣΗ(322->350)=1,087		34,693	45,988	41,347	54,765	56,535	39,852	51,992	27,947	29,522	28,537	19,411
C(cal.curve)_sample		27,872	29,002	28,919	27,912	31,114	32,850	32,357	15,699	15,259	15,895	14,345
slope1 (st.ad.)		1232,7	3915,5	1307	993,42	6650,4	27276	20907	968,58	5869,7	31065	17604
slope2 (cal.curve)		1612,8	5104,4	1470,9	1753,8	12274	53651	39952	1707,1	11390	55971	30763
(slope2-slope1)		380,1	1188,9	163,9	760,38	5623,6	26375	19045	738,52	5520,3	24906	13159
(slope1-slope2)*100%		23,6	23,3	11,7	43,4	45,8	49,2	47,7	43,3	48,5	44,5	42,8

Πίνακας 7.5: Ποσοτικός προσδιορισμός τριαζολών και έλεγχος παρεμπόδισης μήτρας σε υγρό δείγμα Β' Δεξαμενής από τον Σταθμό Βιολογικής Επεξεργασίας Λυμάτων (14/12/2005)

	C (ppb)	REACTIONS										
		1H-BZT (area)			tolyl-TZL (area)				5,6-Dimethyl-1H-Benzotriazole			
		fragm1 (39)	fragm2 (65)	fragm3 (92)	fragm4 (39)	fragm5 (51)	fragm6 (77)	fragm7 (79)	fragm8 (39)	fragm9 (51)	fragm10 (77)	fragm11 (91)
blank (water+MeOH)	0	0	0	0	193	0	408	611	0	0	0	0
calibration2	20	25958	91666	28343	33374	214212	960768	730527	27934	222935	1025919	569215
calibration3	40	54002	192623	61962	68828	486215	1982938	1494868	67623	462125	2298508	1220971
calibration4	80	125610	421197	136024	137590	981013	4234793	3129165	143609	868560	4664869	2333408
calibration5	160	254105	807656	231871	280314	1950557	8518403	6358065	269112	2E+06	8892383	4927271
sample (without spike)	0	344506	1264741	370015	68496	478631	2006112	1545063	21645	121097	610445	384570
spike1	20	416273	1412777	431047	100524	656076	2772194	2144116	41567	271389	1425174	800892
spike2	40	454786	1645537	507841	122655	855815	3560600	2697023	77192	427177	2239515	1189748
spike3	80	545174	1957293	605006	178175	1220609	5280068	4063128	123064	728958	3943964	2059788
spike4	160	689417	2405411	733785	289965	1945960	8264576	6219852	221501	1E+06	7093674	3803246
C(st.ad.)_fragments		39,2913	139,884	176,147	50,6385	52,3159	50,8259	67,9648	17,1861	15,687	15,40649	16,9449
ΑΡΑΙΩΣΗ(322-->350)=1,087		42,710	152,053	191,472	55,044	56,867	55,248	73,878	18,681	17,052	16,747	18,419
C(cal.curve)_sample		235,187	270,043	271,141	43,118	43,206	42,129	44,251	14,234	12,137	11,532	14,746
slope1 (st.ad.)		1548	7148,8	2242,4	1373,5	9183,2	39350	29427	1256,6	7642,9	40614	21413
slope2 (cal.curve)		1612,8	5104,4	1470,9	1753,8	12274	53651	40404	1707,1	11390	55971	30763
(slope2-slope1)		64,8	-2044,4	-771,5	380,3	3090,8	14301	10977	450,5	3747,1	15357	9350
(slope1-slope2)*100%		4,0	-40,1	-52,5	21,7	25,2	26,7	27,2	26,4	32,9	27,4	30,4

