

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

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ
ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΒΙΟΚΤΟΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΥΠΟΥ ΒΕΝΖΟΘΕΙΑΖΟΛΙΩΝ ΣΕ
ΑΣΤΙΚΑ ΛΥΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ**

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΜΥΛΩΝΑ ΚΥΡΙΑΚΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007

**Στον Νικόλαο Λυρώνη
για την αγάπη και συμπαράστασή του
όλα αυτά τα χρόνια**

Εξεταστική Επιτροπή :

Ευριπίδης Στεφάνου, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης (επιβλέπων)
Χαράλαμπος Κατερινόπουλος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης
Σπυρίδων Περγαντής, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Χημικών Διεργασιών (ΕΠΕΧΗΔΙ) του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Επιστήμες και Μηχανική Περιβάλλοντος».

Αντικείμενο της μελέτης είναι ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των βενζοθειαζολίων σε μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων καθώς και ο προσδιορισμός τους σε εμπορικά προϊόντα.

Τόσο το θέμα της διατριβής όσο και η επιβεβλημένη για τη διεκπεραίωση αυτής ενασχόλησή μου σε εργαστήριο Περιβαλλοντικής Αναλυτικής Χημείας, χώρο άγνωστο λόγω της διαφορετικής προπτυχιακής μου αφετηρίας, λειτούργησαν ως πρόκληση τροφοδοτώντας με κίνητρα όλη αυτή την προσπάθεια. Για την ευκαιρία που μου προσφέρθηκε καθώς και για την εμπιστοσύνη, την πολύτιμη και συνεχής καθοδήγηση που έτυχα ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή Δρ. Ε. Στεφάνου. Ευχαριστώ επίσης τους καθηγητές και μέλη της εξεταστικής επιτροπής Δρ. Σ. Περγαντή και Δρ. Χ. Κατερινόπουλο για τις χρήσιμες υποδείξεις τους και ιδιαίτερα τον Δρ. Σ. Περγαντή για τη συνεργασία μας καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Ασφαλώς απαρχή αυτής της προσπάθειας αποτέλεσε η εισαγωγή μου στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών από το οποίο αποφοιτώ με τη βεβαιότητα ότι αποκόμισα όλα εκείνα τα θετικά στοιχεία τα οποία με οδήγησαν προς το Τμήμα Χημείας και τον τομέα Περιβάλλοντος. Για το λόγο αυτό και φυσικά για τη δυνατότητα εγγραφής μου στο πρόγραμμα ευχαριστώ όλους τους καθηγητές του μεταπτυχιακού προγράμματος «Επιστήμες και Μηχανική Περιβάλλοντος». Ευχαριστώ επίσης τους καθηγητές μου στο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης του Τμήματος Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος στους οποίους οφείλω το ασφαλές υπόβαθρο όπου στηρίχθηκε η επιτυχής ανταπόκριση στις απαιτήσεις του προγράμματος. Από τους καθηγητές μου στο τμήμα Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον καθηγητή Δρ. Ν. Λυδάκη – Σημαντήρη για την ενθάρρυνση και την στήριξή του στην επιλογή μου αυτή και για το συνεχές ενδιαφέρον του καθ' όλη τη διάρκεια φοίτησης μου στο Τμήμα Χημείας. Επίσης αισθάνομαι την ανάγκη να

ευχαριστήσω τη γεωλόγο - μελετητή κα Α. Παυλάκη η οποία στήριξε την επιλογή μου αυτή και πίστευε πάντα σε μένα.

Εξαιρετικά σημαντικές για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής διατριβής στάθηκαν οι γνώσεις και η εργαστηριακή εμπειρία του Δρ. Α. Κουβαράκη, τον οποίο ευχαριστώ ολόψυχα. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Μ. Αποστολάκη για τις χρήσιμες και ουσιώδεις υποδείξεις της, για το συνεχές ενδιαφέρον της και τη συμπαράστασή της σε όλα τα επίπεδα. Παράβλεψη θα ήταν αν δεν ευχαριστούσα τον Δρ. Μ. Μανδαλάκη, ο οποίος σε κάθε ερώτηση και απορία μου ήταν και αυτός πρόθυμος να με βοηθήσει. Επίσης ευχαριστώ θερμά το Δρ. Γ. Κουβαράκη ο οποίος συνέβαλε ενεργά στο πρακτικό μέρος της διατριβής αυτής και ειδικότερα στη δειγματοληψία καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Βαθύτατα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Η. Hansen και τον V. Nischwitz γιατί με τις πολύτιμες γνώσεις, τις εύστοχες υποδείξεις αλλά και την εργαστηριακή τους εμπειρία συνέβαλαν σημαντικά στην αντιμετώπιση ποικίλων δυσκολιών στην πειραματική διαδικασία.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον χημικό μηχανικό και τεχνικό διευθυντή της Δ.Ε.Υ.Α.Η. κ. Χ. Παπαδογιάννη καθώς και την κ. Κ. Σιφακάκη των οποίων η βοήθεια όσον αφορά τόσο το σχεδιασμό και εκτέλεση της δειγματοληψίας όσο και την κατανόηση λειτουργιών της μονάδας επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ήταν καθοριστική. Ευχαριστώ επίσης όλους τους συναδέλφους μου που μοιραζόμασταν πολλές ώρες στο εργαστήριο για το άψογο κλίμα που επικρατούσε, την άρτια συνεργασία και τις εποικοδομητικές συζητήσεις.

Επιπρόσθετα, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, αφού στήριξαν εξ' αρχής την επιλογή μου και ενίσχυσαν οικονομικά και αυτή την προσπάθεια. Τέλος, δεν θα μπορούσα ως μέλος της οικογένειάς μου να παραλείψω να αναφερθώ στον Ν. Λυρώνη. Τον ευχαριστώ ολόψυχα για την αγάπη του, την υπομονή του, την στήριξη και ενθάρρυνση που μου δίνει πάντα καθώς επίσης για την ηθική συμπαράσταση και ουσιαστική βοήθειά του κατά τη διάρκεια φοίτησής μου τόσο στο Τμήμα Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος όσο και στο Τμήμα Χημείας.

Π Ε Ρ Ι Λ Η Ψ Η

Οι περιβαλλοντικές ανησυχίες της ποιότητας του νερού και του εδάφους έχουν αλλάξει εντυπωσιακά τα τελευταία χρόνια. Εκτός από τους κλασικούς ρυπαντές (π.χ. PAHs, οργανοχλωρικά φυτοφάρμακα, PCBs) ένας μακρύς κατάλογος πιθανών μολυσματικών παραγόντων προέκυψε (ECs) : ενώσεις που επηρεάζουν το ενδοκρινικό σύστημα, φαρμακευτικά είδη, βιοκτόνες ουσίες, πρόσθετες ουσίες βενζίνης, ανασταλτικοί παράγοντες διάβρωσης, πολυφθοριωμένα επιφανειοδραστικά και επιβραδυντικά φλόγας.

Η παρούσα διατριβή εστιάζει στον προσδιορισμό των βιοκτόνων ουσιών τύπου βενζοθειαζολίων σε βιολογικό σταθμό στο Ηράκλειο της Κρήτης. Τα βενζοθειαζόλια είναι μέρος της μοριακής δομής μεγάλων ομάδων φυσικών προϊόντων, βιοκτόνων ουσιών, φαρμάκων, αρωματικών ουσιών σε φαγητά καθώς επίσης υπάρχουν και στις χημικές βιομηχανίες. Εμφανίζονται στο περιβάλλον κυρίως ως αποτέλεσμα της παραγωγής και της χρήσης τους ως επιταχυντές θείωσης στη βιομηχανία των ελαστικών.

Προκειμένου να ερευνηθεί η ύπαρξη και η συμπεριφορά στο περιβάλλον αυτών των αναδυόμενων ρυπαντών κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων, αναπτύχθηκε μία μέθοδος η οποία βασίζεται στην Υγρή Χρωματογραφία σε συνδυασμό με διαδοχική φασματομετρία μαζών για τον προσδιορισμό των βενζοθειαζολίων. Οι ενώσεις αυτές ανιχνεύθηκαν σε σημαντικά ποσοστά, τόσο στην εισροή όσο και στην εκροή του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου στη διαλυτή και σωματιδιακή φάση. Η μέση συνολική συγκέντρωση των βενζοθειαζολίων κυμαίνεται από 0,5 έως 5,7 $\mu\text{g/L}$ στην εισροή και στην εκροή του σταθμού. Το 2-υδροξυβενζοθειαζόλιο (OHBT) έχει με τη μεγαλύτερη αφθονία. Η απομάκρυνση των βενζοθειαζολίων είναι πολύ χαμηλή κατά τη διάρκεια της βιολογικής επεξεργασίας.

Επιπλέον, σε αυτή τη μελέτη, για τον προσδιορισμό βενζοθειαζολίων, αναλύθηκαν δείγματα απορροής, λάστιχα αυτοκινήτων, αντιψυκτικό υγρό, καθώς επίσης και απορρυπαντικό πλυντηρίου πιάτων (Calgonit) και αποσκληρυντικό νερού (Calgon). Οι συνολικές συγκεντρώσεις των βενζοθειαζολίων στα δείγματα απορροών κυμάνθηκαν από 0,03-4,28 $\mu\text{g/L}$, με το 2-μερκαπτοβενζοθειαζόλιο (MBT) να κατέχει το μεγαλύτερο ποσοστό (56%-68%), ακολούθησε το βενζοθειαζόλιο (BT) και το 2-αμινοβενζοθειαζόλιο (ABT). Τα λάστιχα αυτοκινήτων περιείχαν 0,05-0,08 $\mu\text{g/g}$ ABT, 7,22-44,87 $\mu\text{g/g}$ BT, 0,24-0,67 $\mu\text{g/g}$ 2-μεθυλθειοβενζοθειαζόλιο (MTBT), 27,68-40,74 $\mu\text{g/g}$ OHBT και 0,05-0,12 $\mu\text{g/g}$ MBT. Οι συνολικές συγκεντρώσεις των βενζοθειαζολίων στο αντιψυκτικό υγρό κυμάνθηκαν από 2,95-157,97 $\mu\text{g/L}$, με το MBT να βρίσκεται στο μεγαλύτερο ποσοστό (96%), και να ακολουθεί το

BT και το ABT. Το απορρυπαντικό πλυντηρίου πιάτων περιείχε 0,57 $\mu\text{g/g}$ MTBT, ακολουθούσε το BT, το ABT και το OHBT ενώ το αποσκληρυντικό πλυντηρίου περιείχε 1,18 $\mu\text{g/g}$ MBT και 0,03 $\mu\text{g/g}$ BT και OHBT.

A B S T R A C T

The environmental concerns of water and soil quality have changed dramatically over the past few years. Besides the classic pollutants (e.g. PAHs, organochlorine pesticides, PCBs) a long list of potential contaminants emerged (ECs): endocrine disrupters, pharmaceuticals, biocides, gasoline additives, corrosion inhibitors, polyfluorinated surfactants and flame retardants.

This study focuses on the determination of biocides such as benzothiazoles in wastewater treatment plants. Benzothiazoles are a part of the molecular structure of a large number of natural products, biocides, drugs, food flavors, and industrial chemicals. They also appear in the environment mainly as a result of their production and use as rubber vulcanization accelerators.

In order to investigate the environmental occurrence and behavior of these emerging contaminants during wastewater treatment sensitive analytical methods based on LC-MSⁿ were developed for benzothiazoles. We detected these compounds in significant amounts, in both influents and effluents of the municipal wastewater treatment plant (WWTP) of Heraklion in both the dissolved and particulate phase. The mean total concentration of benzothiazoles ranged from 0,5-5,7 µg/L in the influent and effluent of the WWTP. OHBT was the most abundant compound. The removal of benzothiazoles is rather very low during biological treatment.

Moreover, several urban runoff samples, car tires, antifreezing liquid, as well as dishwasher detergent (Calgonit) and water softener (Calgon) were analyzed for benzothiazoles in the present study. Total concentrations of benzothiazoles in urban runoff samples ranged from 0,03-4,28 µg/L, with 2-mercaptobenzothiazole (MBT) being most prominent (56%-68%), followed by benzothiazole (BT) and 2-aminobenzothiazole (ABT). The car tires contained 0,05-0,08 µg/g of ABT, 7,22-44,87 µg/g of BT, 0,24-0,67 µg/g of 2-methylthiobenzothiazole (MTBT), 27,68-40,74 µg/g of 2-hydroxybenzothiazole (OHBT) and 0,05-0,12 µg/g of MBT. Total concentrations of benzothiazoles in antifreezing liquid ranged from 2,95-157,97 µg/L, with 2-mercaptobenzothiazole (MBT) being most prominent (96%), followed by benzothiazole (BT) and 2-aminobenzothiazole (ABT). The dishwasher detergent contained 0,57 µg/g of MTBT followed by BT, ABT and OHBT and the water softener 1,18 µg/g of MBT and 0,03 µg/g of BT and OHBT.

Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	12
ΚΕΦ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1 Βιβλιογραφική αναδρομή.....	12
1.1.1 Δομή βενζοθειαζολίων.....	12
1.1.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες βενζοθειαζολίων	13
1.1.3 Πηγές και χρήση βενζοθειαζολίων.....	17
1.1.4 Τοξικότητα των βενζοθειαζολίων.....	19
1.1.5 Βιομετασχηματισμός των βενζοθειαζολίων.....	21
1.2 Προσρόφηση βενζοθειαζολίων σε αιωρούμενα σωματίδια στο νερό	27
1.2.1 Μηχανισμοί προσρόφησης	28
1.2.2 Ισόθερμα προσρόφησης	30
1.3 Διαδικασίες επεξεργασίας αστικών υγρών αποβλήτων.....	31
1.3.1 Διαδικασία επεξεργασίας λυμάτων στον βιολογικό σταθμό Ηρακλείου	32
1.4 Αντικείμενο και στόχοι της παρούσας διατριβής.....	33
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	35
ΚΕΦ 2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ	35
2.1 Αντιδραστήρια	35
2.2 Δειγματοληψία	35
2.3 Προεπεξεργασία δειγμάτων	38
2.4 Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction)	39
2.5 Συνεχής Εκχύλιση (Soxhlet).....	43
2.6 Υγρή Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης.....	45
2.7 Οργανολογία συστήματος HPLC	47
2.7.1 Δοχεία διαλυτών	49
2.7.2 Είδη έκλουσης	50

2.7.3	Αντλίες HPLC	52
2.7.4	Συστήματα εισαγωγής δείγματος.....	53
2.7.5	Αναλυτικές στήλες	55
2.7.6	Ανιχνευτές.....	58
2.7.7	Συστήματα καταγραφής αποτελεσμάτων	61
2.8	Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με Ηλεκτροψεκασμό και Διαδοχική Φασματομετρία Μαζών (HPLC-ESI-MS/MS).	62
III.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	69
ΚΕΦ 3.	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	69
3.1	Μέθοδος Υγρής Χρωματογραφικής Ανάλυσης.....	69
3.2	Ηλεκτροψεκασμός	72
3.3	Τεχνική σάρωσης με μελέτη χαρακτηριστικών αντιδράσεων	73
3.4	Επιλογή θυγατρικών ιόντων και προσδιορισμός της βέλτιστης ενέργειας πρόσκρουσης και εφαρμοζόμενου δυναμικού κυλινδρικού φακού.	75
3.5	Μηχανισμοί θραυσματοποίησης των βενζοθειαζολίων	81
3.6	Επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα της αναλυτικής διαδικασίας των βενζοθειαζολίων	83
3.7	Ανάκτηση της μεθόδου.....	85
3.8	Όριο ανίχνευσης του φασματογράφου μάζας.....	93
3.9	Όριο ανίχνευσης της μεθόδου (MDL).....	95
3.10	Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)	95
ΚΕΦ 4.	ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΕΝΖΟΘΕΙΑΖΟΛΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟΡΡΟΗΣ ΔΡΟΜΟΥ, ΣΕ ΛΑΣΤΙΧΑ ΑΥΤΟΚΙΝΗΤΟΥ ΚΑΙ ΣΕ ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ	98
4.1	Ποσοτικός προσδιορισμός βενζοθειαζολίων σε δείγματα απορροής δρόμου.....	98
4.2	Ποσοτικός προσδιορισμός βενζοθειαζολίων σε λάστιχα αυτοκινήτου.....	102
4.3	Ποσοτικός προσδιορισμός βενζοθειαζολίων σε εμπορικά προϊόντα	104
ΚΕΦ 5.	ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΕΝΖΟΘΕΙΑΖΟΛΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΣΤΑΘΜΟΥ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ	106

5.1 Ποιοτικός προσδιορισμός βενζοθειαζολίων σε δείγματα υγρών αποβλήτων	106
5.2 Επίδραση της μήτρας του δείγματος- Μέθοδος γνωστής προσθήκης.....	110
5.3 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων για τον έλεγχο παρεμποδίσεων της μήτρας του δείγματος	113
5.4 Ποσοτικός προσδιορισμός βενζοθειαζολίων σε δείγματα υγρών αποβλήτων	120
5.4.1 Διαλυτή φάση.....	121
5.4.2 Σωματιδιακή φάση.....	126
5.4.3 Σύγκριση διαλυτής και σωματιδιακής φάσης σε δείγματα υγρών αποβλήτων	132
5.5 Συσχέτιση του MBT με το MTBT από δεδομένα βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου ...	135
5.6 Συσχέτιση των συγκεντρώσεων στη σωματιδιακή και διαλυτή φάση με χρήση ισοθέρμων προσρόφησης.....	136
IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	140
ΚΕΦ 6.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	140
6.1 Συμπεράσματα που αφορούν στην ανάπτυξη και στην βελτιστοποίηση της αναλυτικής μεθόδου.....	140
6.2 Συμπεράσματα τα οποία προέκυψαν από τη μελέτη περιβαλλοντικών δειγμάτων	143
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	147
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	153

Ι.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

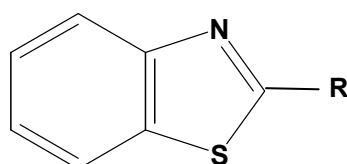
1.1 Βιβλιογραφική αναδρομή

Τα τελευταία χρόνια η ανησυχία για την ποιότητα του ύδατος έχει εστιαστεί σε “νέους” ρυπαντές. Εκτός από τους κλασικούς ρυπαντές (π.χ. χλωριωμένα διφαινύλια, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες κ.α.) έχει προκύψει ευρεία γκάμα πιθανών νέων ρυπαντικών παραγόντων, σε μικρές συγκεντρώσεις (μικρορυπαντές), όπως οι φαρμακευτικές ουσίες, τα προσθετικά της βενζίνης, οι επιβραδυντές ανάφλεξης, οι ανασταλτικοί παράγοντες διάβρωσης και οι βιοκτόνες ουσίες. Στην τελευταία κατηγορία συγκαταλέγονται οι ενώσεις τις οποίες πραγματεύεται η παρούσα εργασία και οι οποίες ανήκουν ως προς τη χημική τους δομή στην ομάδα των βενζοθειαζολίων.

Στην παράγραφο 1.1 θα γίνει λόγος για τη δομή αυτών των ενώσεων, τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, την πολικότητά τους, την τοξικότητα και βιοδιάσπασή τους έτσι όπως προκύπτουν από τη βιβλιογραφία.

1.1.1 Δομή βενζοθειαζολίων

Τα βενζοθειαζόλια αποτελούν ένα μέρος των ξενοβιοτικών, ετεροκυκλικών, μοριακών δομών περιλαμβάνοντας ένα δακτύλιο βενζολίου ο οποίος συνενώνεται με ένα δακτύλιο θειαζόλης. Η γενική δομή των βενζοθειαζολίων παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.1.



Σχήμα 1.1 : Γενική δομή βενζοθειαζολίων

Ανάλογα με την ομάδα που υπάρχει στη θέση 2 (Σχήμα 1.1) τα βενζοθειαζόλια αποκτούν διαφορετική χημική ονομασία. Η ομάδα R αναφέρεται πλήρως ακολουθούμενη από το όνομα του ετεροκυκλικού. Στην παρούσα εργασία θα

μελετηθούν τα βενζοθειαζόλια που παρατίθενται στον Πίνακα 1.1 και θα συμβολίζονται για λόγους ευκολίας με τα ακρωνύμιά τους.

Πίνακας 1.1 : Δομές και ακρωνύμια των υπό μελέτη βενζοθειαζολίων

<i>Χημική ονομασία</i>	<i>-R</i>	<i>Ακρωνύμιο</i>
Βενζοθειαζόλιο	-H	BT
2-μερκαπτοβενζοθειαζόλιο	-SH	MBT
2-υδροξυβενζοθειαζόλιο	-OH	OHBT
6-καρβόξυλο βενζοθειαζόλιο	-COOH	BTCA
2-μεθυλθειοβενζοθειαζόλιο	-S-CH ₃	MTBT
2-αμινοβενζοθειαζόλιο	-NH ₂	ABT

1.1.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες βενζοθειαζολίων

Τα βενζοθειαζόλια σε θερμοκρασία δωματίου βρίσκονται σε στερεά μορφή με εξαίρεση το BT το οποίο βρίσκεται σε υγρή. Ο Πίνακας 1.2 δείχνει ότι το BT κατέχει μια υψηλή διαλυτότητα στο νερό (4300 mg/L) και αυτό οφείλεται πιθανώς στην υψηλή πολικότητά του και στο γεγονός ότι είναι σε υγρή φάση σε θερμοκρασία δωματίου. Το BT θεωρείται επίσης πτητική ουσία με τάση ατμών 0,0143 mmHg (25°C).

Το OHBT έχει μια καλή διαλυτότητα στο νερό (2354 mg/L) και ακολουθεί το ABT με 310,3 mg/L. Οι τιμές της διαλυτότητας και της αντίστοιχης τάσης ατμών των MBT και MTBT (0.000464 και 0.00026 mmHg) τις κάνουν να θεωρούνται ως μη πτητικές ενώσεις σε υδατικά διαλύματα (ή ενώσεις που εξατμίζονται με δυσκολία). Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί (*Brownlee, 1992*), έχει διαπιστωθεί πως η διαλυτότητα κάποιων βενζοθειαζολίων εξαρτάται από το pH και τη θερμοκρασία του νερού. Για παράδειγμα, η διαλυτότητα του MBT ενισχύθηκε και παρουσίασε εξάρτηση pH που δείχνει ότι η ιονισμένη μορφή είναι περισσότερο διαλυτή στο νερό (*Brownlee, 1992*).

Εκτός από τη διαλυτότητα των ενώσεων στο νερό, στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζεται το μοριακό βάρος της κάθε προς ανάλυση ένωσης, το σημείο τήξης και βρασμού, όπου αυτό ήταν διαθέσιμο, η πυκνότητα, η τάση ατμών και ο συντελεστής κατανομής, ο οποίος θα παρουσιαστεί αναλυτικά παρακάτω.

Πίνακας 1.2 : Φυσικοχημικές ιδιότητες των βενζοθειαζολίων

Ένωση	BT	MBT	OHBT	BTSA	MTBT	ABT
Κωδικός	95-16-8	149-30-4	934-34-9	3622-35-3	615-22-5	136-95-8
Μοριακό βάρος	135 ¹	167 ¹	151 ¹	179 ¹	181 ¹	150 ¹
Σημείο τήξης (°C)	2 ²	181 ²	139 ²		44 ²	132 ²
Σημείο βρασμού (°C)	230 ²	260 ²	360 ²		177 ³	Μη διαθέσιμο
Πυκνότητα	1,238	1,42				
Τάση ατμών (mm Hg)	0,09 ²	Μη διαθέσιμο	2,57E-05 ²		0,00026 ²	0,000112 ²
Συντελεστής κατανομής(logK _{ow})	2,17 ¹	2,86 ¹	2,35 ¹		3,22 ¹	2,00 ¹
Διαλυτότητα (mg/L 25 °C)	4300 ¹	120 ¹	2354 ¹		125 ¹	310,3 ¹

¹ : Kirouani-Harani (2003) ² : Syracuse Research Corporation (2005) ³ : Klöpfer (2005)

Σταθερότητα των ενώσεων

Τα βενζοθειαζόλια που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία είναι κυρίως τα MBT, TCMTB (θειόκυανομέθυλθειόβενζοθειαζόλιο) καθώς και τα βενζοθειαζολοσουλφεναμίδια. Το TCMTB και τα βενζοθειαζολοσουλφεναμίδια είναι πολύ δραστικά και μετατρέπονται ταχύτατα κατά τη διάρκεια ή μετά τη χρήση τους. Για παράδειγμα το TCMTB υδρολύεται σε MBT και BT και ενώ αυτή χρησιμοποιείται στην επεξεργασία δέρματος, εξαιτίας των γρήγορων αντιδράσεων υδρόλυσης, δεν μπορούσε πια να ανιχνευθεί στην εκροή βιομηχανικού συστήματος καθαρισμού βυρσοδεψείων, αλλά τελικά ήταν ανιχνεύσιμα μόνο τα προαναφερόμενα προϊόντα μετατροπής του TCMTB (*Reemtsma, 1995*).

Τα χρησιμοποιούμενα βενζοθειαζολοσουλφεναμίδια στην παραγωγή ελαστικών αποσυντίθενται σε θερμοκρασίες 100-250 °C για την παραγωγή του MBT. Εκτός των άλλων τα βενζοθειαζολοσουλφεναμίδια είναι ευαίσθητα στο νερό, όπου μέσω της διάσπασης της αμίνης αντιδρούν με το MBT παράγοντας MBTS (δι-(2-βενζοθειαζολυλο)-δισουλφίδιο) ή σουλφινικό οξύ (BT-S(=O)OH) ή σουλφονικό οξύ (BTSA) (*Klöpfer, 2005*).

Το MBT είναι σταθερότερο από τα βενζοθειαζολοσουλφεναμίδια ή το TCMTB και λιγότερο ευαίσθητο στην υδρόλυση. Βέβαια, εξαιτίας της ελεύθερης ομάδας -SH το MBT τείνει να δώσει αντιδράσεις οξειδωσης παράγοντας MBTS. Επίσης, το MBT μετατρέπεται φωτοχημικά. Κάτω από προσομοιωμένες συνθήκες περιβάλλοντος το MBT αντιδρά σε υδατικό διάλυμα παράγοντας πρώτιστα BT και OHBT (*Malouki, 2004*).

Το BT δεν μετατρέπεται μέσω φωτοχημικών διεργασιών. Αντίθετα επιτυγχάνεται μέσα σε λίγα λεπτά η γρήγορη και πλήρης μετατροπή του με τη βοήθεια αντίδρασης με H_2O_2 (Andreozzi, 2001).

Για την φωτοχημική συμπεριφορά των βενζοθειαζολίων BTCA, MTBT, ABT και OHBT δεν υπάρχουν πληροφορίες στη βιβλιογραφία.

Πολικότητα βενζοθειαζολίων

Η πολικότητα και η λιποφιλία είναι βασικά χαρακτηριστικά ώστε να μπορεί να γίνει κατανοητό πως τα βενζοθειαζόλια λειτουργούν σε υδατικό περιβάλλον, όπως για παράδειγμα ο τρόπος με τον οποίο βιοσυσσωρεύονται σε αυτό.

Τα βενζοθειαζόλια, ανάλογα με το είδος των λειτουργικών ομάδων, μπορούν να έχουν πολύ διαφορετική πολικότητα. Στον Πίνακα 1.3 παρατίθενται οι τιμές του συντελεστή λιποφιλίας $\log K_{ow}$ σε διάφορες τιμές pH και οι τιμές του pK_a για πέντε από τις έξι ενώσεις που θα μελετηθούν στην παρούσα εργασία.

Οι τιμές του Πίνακα 1.3 που βρίσκονται στο πάνω μέρος υπολογίστηκαν μέσω του λογισμικού ACD/Labs (Advanced Chemistry Development Inc. 1994-2002) από τον Klöpper (Klöpper, 2005) ενώ στο κάτω μέρος του πίνακα παρουσιάζονται τιμές που έχουν δημοσιευτεί από άλλους συγγραφείς για την pK_a και το $\log K_{ow}$.

Οι μεγάλες διακυμάνσεις στις τιμές των pK_a και $\log K_{ow}$ πιθανόν να οφείλονται στις διαφορετικές πειραματικές καθώς και εξωτερικές συνθήκες, όπως επίσης, και στην ακρίβεια της μέτρησης.

Οι τιμές του $\log K_{ow}$ για τα MBT, OHBT, ABT και BT κυμαίνονται από 1,8 έως 2,4. Υπάρχει βέβαια μια βασική διαφορά στην οξύτητα και βασικότητα αυτών των ουσιών. Ενώ το MBT και το OHBT είναι πολύ ασθενή οξέα, το ABT έχει ασθενή βασικό χαρακτήρα και το BT πολύ ασθενή βασικό χαρακτήρα. Το MTBT είναι η μη πολική ένωση στην ομάδα των βενζοθειαζολίων ($\log K_{ow}=3,1$) και αποτελεί όπως το BT μια πολύ ασθενή βάση.

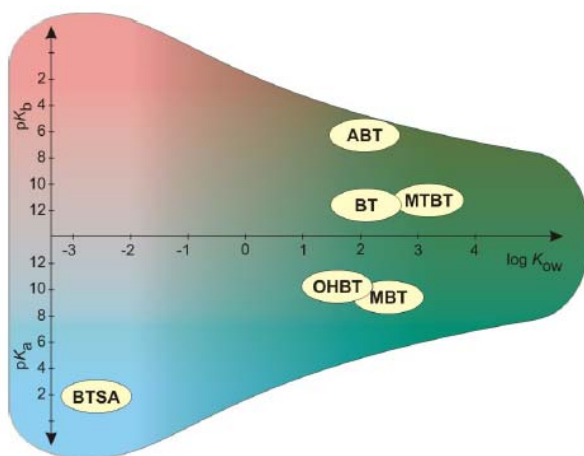
Επίσης τα θείολ-θείον ταυτομερή του MBT και OHBT εξαρτώνται από το pH. Αυτό πρέπει να ληφθεί υπόψη ιδιαίτερα κατά τον καθορισμό των φυσικοχημικών παραμέτρων και ιδιαίτερα στην ανάλυση αυτών των ουσιών.

Πίνακας 1.3 : Τιμές των pKa, pKb και logK_{ow} από διαφορετικές πηγές (Klöpfer, 2005)

		MBT	OHBT	ABT	BT	MTBT
Υπολογισμένα στοιχεία						
Log Kow σε μη φορτισμένα μόρια		2,377+/-0,745	1,76+/-0,250	2,01+/-0,297	2,01+/-0,297	3,100+/-0,194
Log Kow	pH 1	2,38	1,76	0,56	0,56	1,48
	pH 4	2,38	1,76	2	2	3,08
	pH 7	2,38	1,76	2,01	2,01	3,1
	pH 8	2,37	1,76	2,01	2,01	3,1
	pH 10	1,97	1,62	2,01	2,01	3,1
	pKa	9,8	10,41			
	pKb			6,53	11,56	11,39
Περαιτέρω στοιχεία από διαφορετικές πηγές						
	pKa	6,94 [1]				
		7,03 [2]				
	Log Kow	2,41 [4]		2,00 [6]	2,01 [6, 5]	3,15 [7]
		2,84 [2]	1,76[6]	2,00 [6]	1,99 [4]	3,1 [4]
		1,61 [2]				
		2,42 [2, 5, 6]				

[1] (Malouki, 2004), [2] (BUA, 1991), [3] (Reemtsma, 2000), [4] (Brownlee, 1992), [5] (Merck KGaA, 2005), [6] (SRC, 2005), [7] (Platford, 1983)

Μια γραφική απεικόνιση των τιμών των pKa, pKb και logK_{ow} παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.2, στο οποίο είναι ταξινομημένες οι ενώσεις ABT, BT, MTBT, OHBT και MBT ανάλογα με την οξύτητα, τη βασικότητα και πολικότητά τους.



Σχήμα 1.2 : Πολικότητα και οξύτητα βενζοθειαζολίων (Klöpfer, 2005)

1.1.3 Πηγές και χρήση βενζοθειαζολίων

Τα βενζοθειαζόλια παρασκευάζονται παγκοσμίως και έχουν ποικίλες εφαρμογές. Χρησιμοποιούνται ως μυκητοκτόνα στην επεξεργασία ξυλείας και δέρματος (*Reemtsma, 1995*), ως ζιζανιοκτόνα, ως παράγοντες για την απομάκρυνση αλγών και στη βιομηχανία χαρτιού και πολτού. Αυτές οι εφαρμογές σαφώς δείχνουν ότι τα βενζοθειαζόλια κατέχουν ένα ευρύ φάσμα της βιολογικής δραστηριότητας. Εκτός από τη χρήση τους ως βιοκτόνες ουσίες, τα βενζοθειαζόλια εφαρμόζονται επίσης ως ανασταλτικοί παράγοντες διάβρωσης στα αντιψυκτικά αυτοκινήτου, στα βιομηχανικά συστήματα ψύξης και στη γαλβανική βιομηχανία (*De Wever, 2001*). Επιπλέον, χρησιμοποιούνται ως χημικές ουσίες για την απομάκρυνση βαφής στη συντήρηση του ξύλου, ως παράγοντες επίστρωσης των μεταλλικών επιφανειών, ως φωτοευαίσθητοποιητές στη φωτογραφία και ως συστατικά των αζωτούχων χρωστικών ουσιών (*De Wever, 2001*). Εντούτοις, η κύρια χρήση τους είναι ως επιταχυντές θείωσης στην κατασκευή ελαστικών.

Τα βενζοθειαζόλια εισάγονται στο περιβάλλον από ποικίλες πηγές όπως η διύλιση των ελαστικών προϊόντων, αλλά ιδιαίτερα από τις διαδρομές που συνδέονται με την κατασκευή και τη χρήση του MBT και των ενώσεων που βασίζονται σ' αυτό και χρησιμοποιούνται σαν πρόσθετες ουσίες στα ελαστικά, στις ρόδες του αυτοκινήτου και σε αντιψυκτικά υγρά. Επομένως, διάφορα βενζοθειαζόλια έχουν αναφερθεί στο υδατικό περιβάλλον : Το BT έχει ανιχνευθεί σε νερό ποταμού καθώς και σε πόσιμο νερό. Έχει, επίσης, προσδιοριστεί ως ρύπος επιφανειακού και υπόγειου νερού (*Kirouani-Harani 2003*). Το MBT, το BT και το MTBT έχουν βρεθεί σε υγρά απόβλητα βιολογικών καθαρισμών (*Fiehn, 1998*). Η παρουσία βενζοθειαζολίων στην ατμοσφαιρική εναπόθεση (*Welch, 1990*) έχει αναφερθεί επίσης και εξηγείται από την κίνηση ή από τον αέρα ο οποίος περιέχει σκόνη από τους δρόμους.

Στον Πίνακα 1.4 παρουσιάζεται η ύπαρξη μερικών βενζοθειαζολίων σε διαφορετικά υδατικά συστήματα (*Kirouani-Harani 2003*).

Τα βενζοθειαζόλια σπάνια εμφανίζονται ως φυσικά προϊόντα, όμως είναι μέρος της μοριακής δομής μεγάλων ομάδων φυσικών προϊόντων, βιοκτόνων ουσιών, φαρμάκων, αρωματικών ουσιών σε φαγητά καθώς επίσης υπάρχουν και στις χημικές βιομηχανίες (*Bellavia, 2000*).

Πίνακας 1.4 : Συγκεντρώσεις βενζοθειαζολίων σε διαφορετικά υδατικά συστήματα

Χώρα	Τοποθεσία δειγματοληψίας	Βενζοθειαζόλια	Συγκέντρωση
Γερμανία	Ατμόσφαιρα	BT	ποιοτικός προσδιορισμός
Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής	Νερό αποχέτευσης από Βιομηχανία ελαστικών	BT	20 και 60 µg/L
Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής	Νερό ποταμού	BT	2,3 και 23 µg/L
Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής	Πόσιμο νερό	MTBT	ποιοτικός προσδιορισμός
Ανταρκτική	Θαλάσσιο νερό	MTBT	17 ng/L
Ανταρκτική	Θαλάσσιο νερό	BT	6-37 ng/L
Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής	Νερό αποχέτευσης από Βιομηχανία ελαστικών	MBT	0,54-0,71 mg/L

Το MBT είναι η πιο σημαντική σε χρήση από όλα τα βενζοθειαζόλια. Στην πραγματικότητα, η ανακάλυψή της περίπου το 1920 οδήγησε στη σημαντικότερη χρήση του, σαν πρόσθετη χημική ουσία στην παραγωγή ελαστικών αλλά κυρίως, στη χρήση αυτού ως επιταχυντής θείωσης στη βιομηχανία των ελαστικών. Η ετήσια παραγωγή του στη Δυτική Ευρώπη ανέρχεται στους 40.000 τόνους. Η EPA (Environmental Protection Agency) αναφέρει ότι πάνω από 500 τόνοι μπορούν να εισαχθούν στο περιβάλλον ετησίως (*De Wever, 2001*). Ακόμη, χρησιμοποιείται στην παραγωγή χαρτιού ως παράγοντας οξειδωσης, μπορεί να ενεργήσει ως ανασταλτικός παράγοντας διάβρωσης και επίσης χρησιμοποιείται στην επίστρωση μεταλλικών επιφανειών. Επίσης, σε πολλές έρευνες αναφέρεται πως το MBT χρησιμοποιείται για τις μυκητοκτόνες ιδιότητές του, ή τα αντιμικροβιακά αποτελέσματά του. Επιπλέον, χρησιμοποιείται ως εξωτερικό χημειοθεραπευτικό και αντιμυκητιακό φάρμακο στην ιατρική. Το μεταλλικό άλας (κυρίως ψευδάργυρος) του μερκαπτοβενζοθειαζολίου χρησιμοποιείται κυρίως στις ενώσεις λατέξ. Οι ιδιότητές του για σχηματισμό χηλικών συμπλόκων μπορεί να το οδηγήσει προς τα μεταλλικά ιόντα στα ένζυμα και για το λόγο αυτό το MBT είναι ένας δραστικός αναστολέας της γαλακτικής αφυδρογονάσης (*Kirouani-Harani 2003*).

Το BT χρησιμοποιείται στην παραγωγή ελαστικών. Μεταξύ των επιταχυντών που χρησιμοποιούνται, υπάρχουν διάφορα είδη βενζοθειαζολίων. Τα αρχικά προϊόντα είναι το MBT, το OHBT και το BT.

Το βενζοθειαζόλιο (BT) παράγεται ως υποπροϊόν στα βιομηχανικά προϊόντα και στις βιομηχανικές παραγωγές και ανιχνεύεται σε εκροές βιολογικών καθαρισμών και γενικότερα σε υδατικά συστήματα. Παράγεται, επίσης, ως αποτέλεσμα της χρήσης στα

ελαστικά των αυτοκινήτων. Επιπλέον, η παρουσία του BT σε νερά ποταμών έχει προταθεί ως δείκτης της παρουσίας οδικής απορροής στους ποταμούς. Στην Καλιφόρνια το BT και το MTBT ανιχνεύθηκαν σε νερά απορροής δρόμων. Το BT αναφέρεται επίσης, ως μυκητοκτόνο (Kirouani-Harani 2003) και έχει ανιχνευθεί σε τσάι (*Bellavia, 2000*).

Επιπρόσθετα, το BT βρέθηκε στο πτητικό μέρος του ξύλου δρυός, το οποίο χρησιμοποιείται για την ωρίμανση των κρασιών (*Fiamini, 2005*). Στην Ιταλία αναλύθηκαν δώδεκα κρασιά (πέντε κόκκινα, έξι άσπρα και ένα ροζέ) και προσδιορίστηκε σε αυτά το βενζοθειαζόλιο σε συγκεντρώσεις από 0,24 µg/L έως 1,09 µg/L. Φυσικά, η πρώτη σκέψη για τον προσδιορισμό του BT σε κρασιά, θα ήταν πως πιθανόν να οφείλεται στο ξύλο στο οποίο παραμένει το κρασί για την παλαίωσή του. Όμως, σε αυτή τη μελέτη, αξιοσημείωτο είναι πως και τα δώδεκα αυτά κρασιά που αναλύθηκαν δεν ήταν σε διαδικασία ωρίμανσης. Δεδομένου ότι το BT είναι μέρος διάφορων φυσικών μοριακών δομών, μπορεί να παραχθεί κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης (*Bellavia, 2000*). Επιπλέον, το βενζοθειαζόλιο μπορεί να εισαχθεί στο περιβάλλον από τις διαδικασίες που συσχετίζονται με τη σύνθεση των ξενοβιοτικών ενώσεων και κατά συνέπεια να θεωρείται ρυπαντικός παράγων τροφίμων.

Το ABT χρησιμοποιείται στην παραγωγή χρωστικών αζωτούχων ουσιών και ήταν ο πρώτος τύπος θειαζολίων που αξιοποιήθηκε και συνεχίζει να είναι μια πηγή τεχνικά σημαντικών κόκκινων χρωστικών ουσιών για τους πολυεστέρες και προσελκύει ακόμη και σήμερα το βιομηχανικό ενδιαφέρον.

1.1.4 Τοξικότητα των βενζοθειαζολίων

Τα βενζοθειαζόλια που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία είναι δραστικές ενώσεις και έχουν υψηλή τοξικότητα εξαιτίας της χρήσης τους (π.χ. μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, βακτηριοκτόνα). Επίσης θα πρέπει να δοθεί έμφαση στα προϊόντα διάσπασής τους εξαιτίας της χαμηλής σταθερότητάς τους και της υψηλής διάσπασης σε υδατικά συστήματα.

Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία για την οικοτοξικότητα των βενζοθειαζολίων, παρά μόνο μεμονωμένα. Συνήθως, εξετάζεται το MBT, ενώ για τα υπόλοιπα βενζοθειαζόλια υπάρχουν μόνο αποσπασματικά δεδομένα για την τοξικότητά τους.

Οι περισσότερες έρευνες εστιάζουν στο MBT αφού αυτό αποτελεί βασικό προϊόν διάσπασης του TCMTB στη βιομηχανία των πλαστικών, όπου χρησιμοποιείται σε μεγάλες ποσότητες. Έχει βρεθεί πως το MBT έχει τοξική επίδραση στο ανθρώπινο δέρμα και θεωρείται μαζί με το MBTS αιτία για την επανομαζόμενη “Tennis-shoe-dermatitis” και για έναν τύπο της δερματίτιδας μέσω επαφής (Klöpfer, 2005). Επιπρόσθετα, η χρήση γαντιών από λατέξ μπορεί να δημιουργήσει στον άνθρωπο αλλεργικά επεισόδια. Σε αυτό το πλαίσιο, πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών και του MBT που υπάρχουν στο λατέξ. Θα πρέπει να αναφερθεί επίσης, πως τα αλλεργικά επεισόδια αυξήθηκαν εξαιτίας του λατέξ, αφού τη δεκαετία του 1980 υπήρχε κίνδυνος μετάδοσης του ιού HIV οπότε χρησιμοποιούνταν σε μεγάλες ποσότητες γάντια από λατέξ στον ιατρικό τομέα (Klöpfer, 2005).

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή (MAK Kommission) θεωρεί το MBT ως πιθανή καρκινογόνο ουσία, κατατάσσοντας το στην «Κατηγορία 3» με θεσμοθετημένο ανώτατο όριο εισπνοής $4\text{mg}/\text{m}^3$ (μέγιστη συγκέντρωση σε χώρους εργασίας (Chemie, 2000).

Στην οικοτοξικολογική δράση του MBT συγκαταλέγονται μερικά στοιχεία παλαιότερων και νεότερων δημοσιεύσεων (Reemtsma, 1995, De Wever, 1997) μέσω πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν για την τοξικότητα σε μικροοργανισμούς, άγλη και σε μερικά είδη ψαριών. Η θανατηφόρος συγκέντρωση LC_{50} (συγκέντρωση η οποία προκαλεί θάνατο στο 50% του υπό μελέτη πληθυσμού) μετά από 96 ώρες σε διάφορα είδη ψαριών ήταν 0,7 έως 11 mg/L.

Όσον αφορά τους μικροοργανισμούς το MBT αναστέλλει τη διαδικασία νιτροποίησης (50% έως 100% αναστολή) ακόμη και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 3 mg/L (DeWever, 1997). Οι τιμές της αποτελεσματικής συγκέντρωσης EC_{50} (αντιστοιχεί στη μοριακή συγκέντρωση που μπορεί να προκαλέσει αντίδραση στο 50% του είδους που μελετάται), εξαιτίας της αύξησης της αναστολής, διαφέρουν πολύ ανάλογα με τους οργανισμούς που συμμετέχουν σε πειράματα και κυμαίνονται πάνω από 10 mg/L (De Wever, 1997).

Το BT και MTBT είναι λιγότερο τοξικά από το MBT και οι τιμές της EC_{50} είναι 5 έως 40 φορές μεγαλύτερες από εκείνες του MBT (Reemtsma, 1995). Στον Πίνακα 1.5 παρουσιάζεται η τοξικότητα των βενζοθειαζολίων σε οικοσυστήματα έτσι όπως προκύπτουν από βιβλιογραφικά δεδομένα.

Πίνακας 1.5 : Οικοτοξικότητα βενζοθειαζολίων

Βενζοθειαζόλια	LD ₅₀ (mg/Kg)	EC ₅₀ (mg/L)	LC ₅₀ (mg/L)
MBT	3.000 /100	0,12 (20h) <i>V. fischeri</i>	19 (48h) <i>D. magna</i>
BT	900	4,4 (20h) <i>V.fischeri</i>	110 (48h) <i>Oryzias latipes</i>
OHBT	-	-	-
ABT	-	-	-
MTBT	-	-	-
BTCA	-	-	-

Σε μια πιο πρόσφατη έρευνα για τις ουσίες που δρουν ενδοκρινικά συγκαταλέγεται, εκτός από τις γνωστές ενδοκρινικές διασπάσεις (στεροειδή, αλκυλοφαινόλες), και το OHBT, το οποίο επιδρά ορμονικά. Η τιμή EC₅₀ της επίδρασης στα οιστρογόνα από το OHBT καθορίστηκε στα 6,3 mg/L σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ζυμομύκητες. Αυτή η εργασία ήταν η μοναδική που εξέτασε την ορμονική επίδραση που προκαλείται από τα βενζοθειαζόλια. Θα ήταν βέβαια χρήσιμο αν υπήρχαν δεδομένα και από άλλες εργασίες ώστε να πραγματοποιηθεί σύγκριση των αποτελεσμάτων.

1.1.5 Βιομετασχηματισμός των βενζοθειαζολίων

Ο μετασχηματισμός οργανικών ουσιών μέσω μικροοργανισμών οφείλεται κυρίως σε δύο παράγοντες :

- Εξοικονόμηση ενέργειας (παραγωγή ATP) και κάλυψη της ανάγκης σε άνθρακα για την αναγκαία παραγωγή κυττάρων.

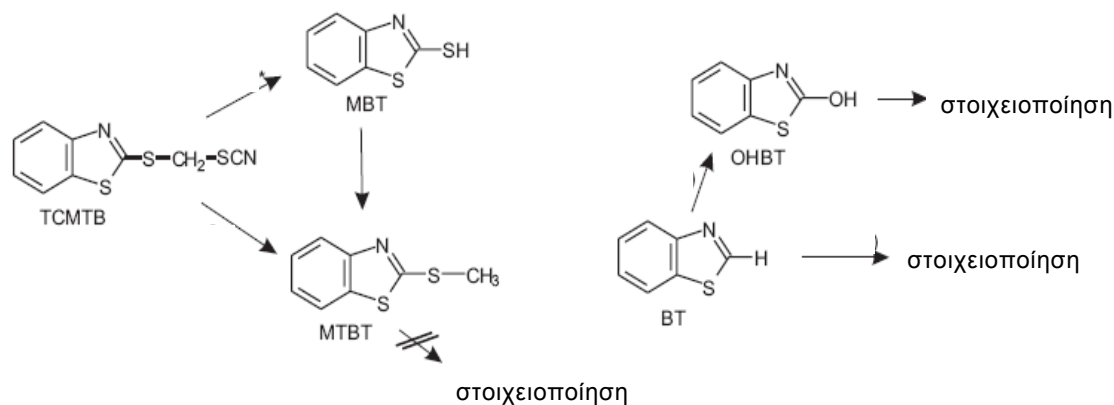
-Απομάκρυνση των επικίνδυνων για τον οργανισμό ουσιών.

Για την εξοικονόμηση ενέργειας και για την παραγωγή κυττάρων οι μικροοργανισμοί ανέπτυξαν εργαλεία (ένζυμα) τα οποία καταρχήν χρησιμεύουν στον μεταβολισμό των θρεπτικών ουσιών (λίπη, υδρογονάνθρακες, πρωτεΐνες). Εκτός από αυτά τα ένζυμα, οι οργανισμοί είναι δυνατόν να περιέχουν και ένα σύνολο από «μη συγκεκριμένα» ένζυμα, τα οποία χρησιμεύουν στην αποτοξικοποίηση ανεπιθύμητων ή βλαβερών ουσιών.

Στη βιβλιογραφία, ο βιομετασχηματισμός των βενζοθειαζολίων εξετάζεται με επώαση σε βιολογικές καλλιέργειες, σε καθαρές καλλιέργειες και στο περιβάλλον.

Οι βιομετασχηματισμοί των βενζοθειαζολίων στο περιβάλλον ή κάτω από προσομοιωμένες συνθήκες περιβάλλοντος δεν έχουν ερευνηθεί αρκετά έως σήμερα. Ο

De Wever (2001) ασχολήθηκε με τη βιοδιάσπαση αυτή και τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας παρατίθενται στο Σχήμα 1.3.



Σχήμα 1.3 : Βιομετασχηματισμός βενζοθειαζολίων στο περιβάλλον. Το TCMTB μετασχηματίζεται αβιοτικά με επίδραση της ακτινοβολίας UV.

Νερά απορροής δρόμων

Για την επίτευξη φυσικών διαδικασιών ο Reddy (Reddy, 1997) ανέμιξε νερό όμβριων υδάτων με BT και OHBT σε συγκέντρωση 15 µg/L. Μετά από οχτώ μέρες διασπάστηκε το 60% του BT σε OHBT. Συνεπώς, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το OHBT σε αυτό το σύστημα αποτελεί τελικό προϊόν αποδόμησης του BT.

Το πείραμα αυτό το επανέλαβε η συγκεκριμένη ομάδα, αλλά δεν κατάφερε να έχει ξανά το παραπάνω αποτέλεσμα. Το OHBT ήταν μόλις ανιχνεύσιμο και μετά από τριάντα ημέρες δεν μπορούσαν να ανιχνεύσουν πλέον καμία από τις δυο αυτές ενώσεις (Σχήμα 1.3). Αυτή τη συμπεριφορά την απέδωσαν στη διαφορετική εποχή που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα, στους πληθυσμούς βακτηρίων που είχαν αναπτυχθεί και στη διαφορετική περιεκτικότητα άλατος του νερού όμβριων υδάτων. Δεν κατάφεραν να εξηγήσουν περαιτέρω το υψηλό ποσοστό διάσπασης (60%) του BT σε OHBT που προσδιόρισαν στο αρχικό τους πείραμα.

Η συγκεκριμένη ομάδα (Reddy, 1997) καθόρισε στα πειράματά της μια συσχέτιση των συγκεντρώσεων BT/OHBT. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ελαστικά και πλαστικά η συσχέτιση αυτή ήταν μεγαλύτερη.

Η ομάδα του Reddy (1997) κατέληξε στο συμπέρασμα πως το BT αποικοδομείται ευκολότερα σε σχέση με το ΟΗΒΤ και γι' αυτό το λόγο διασπάται πιο γρήγορα.

Υπόγεια νερά

Η ομάδα του Reemtsma (1995) ερεύνησε την αποδόμηση των βενζοθειαζολίων σε υπόγεια νερά προσθέτοντας σε αυτά μίγμα βενζοθειαζολίων από 15 έως 30 µg/L. Σε αυτή τη μελέτη παρατηρήθηκε αποδόμηση του ΜΤΒΤ.

Επίσης παρατηρήθηκε μια συσχέτιση του ΜΤΒΤ με το ΜΒΤ. Σε πειράματα που έγιναν το ΜΒΤ μειώθηκε ενώ ταυτόχρονα αυξήθηκε το ΜΤΒΤ. Αυτό, οι επιστήμονες το απέδωσαν στην απορρόφηση του ΜΤΒΤ μέσω οργανικού υλικού, καθώς επίσης και στην μεθυλίωση του ΜΒΤ σε ΜΤΒΤ. Οι συγκεντρώσεις των ΜΤΒΤ και ΜΒΤ σταθεροποιήθηκαν τελικά στην εκροή, κάτι το οποίο εξηγείται από την πλήρη μεθυλίωση του ΜΒΤ.

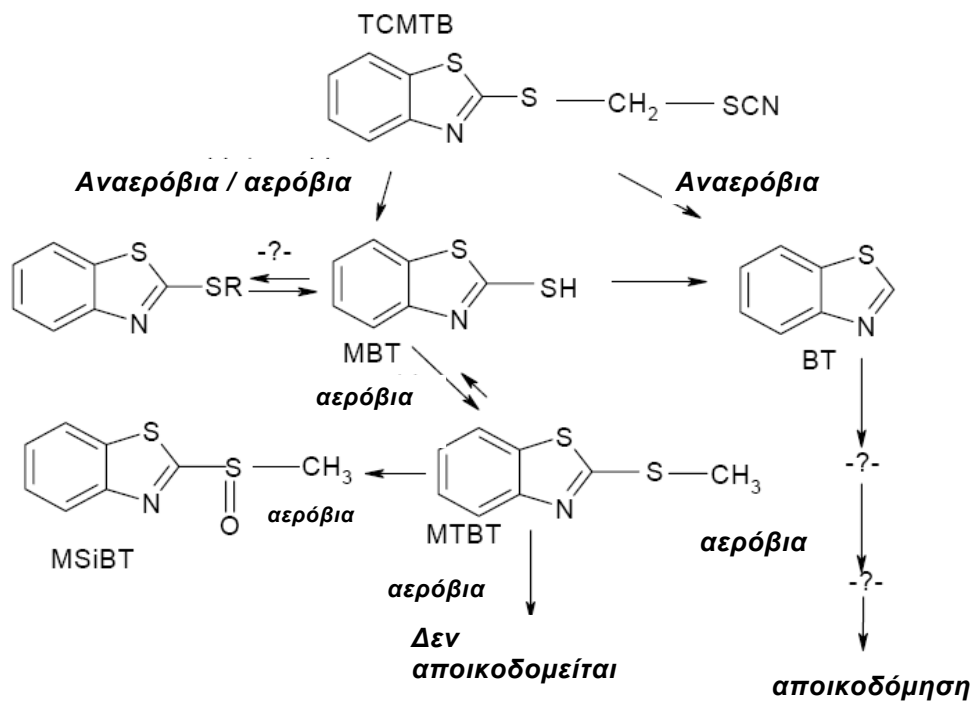
Με την προσθήκη του ΒΤ σε υπόγειο νερό δεν κατάφεραν να ανιχνεύσουν ούτε το ΒΤ ούτε κάποιο άλλο βενζοθειαζόλιο. Ακόμη και η εξέταση ιζημάτων δεν τους έδωσε κάποια παραπάνω πληροφορία, συνεπώς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το ΒΤ αποδομείται πλήρως.

Αερόβιοι μετασχηματισμοί των βενζοθειαζολίων

Έχουν απομονωθεί κάποια είδη μικροοργανισμών τα οποία είναι ικανά να αποικοδομούν τα βενζοθειαζόλια σε αερόβιες συνθήκες. Ο De Wever ήταν από τους πρώτους που απομόνωσαν μια καλλιέργεια, την ονομαζόμενη *Rhodococcus erythropolis* ικανή να αποικοδομεί τα ΟΗΒΤ, ΒΤ αλλά όχι και το ΜΒΤ το οποίο βρέθηκε να αναστέλλει τη βιοδιάσπαση των άλλων βενζοθειαζολίων (De Wever, 1997).

Η ομάδα του Reemtsma (1995) πρότεινε τα μεταβολικά μονοπάτια που παρατίθενται στο Σχήμα 1.4. Το ΤCΜΤΒ μετασχηματίστηκε σε ΜΒΤ. Το ΒΤ αποικοδομήθηκε αερόβια κατά μήκος άγνωστων διαβάσεων. Το ΜΒΤ και το ΒΤ απομακρύνθηκαν ουσιαστικά από την αερόβια επεξεργασία, ενώ το ΜΤΒΤ σχηματίστηκε.

Το ΤCΜΤΒ αποικοδομήθηκε αερόβια σε ποσοστό περίπου 95% μέσα σε 9 έως 12 ημέρες. Το ΜΒΤ ήταν το κύριο προϊόν, ενώ περίπου το 5% του ΤCΜΤΒ εμφανίστηκε να μεθυλιώνεται από ΜΒΤ σε ΜΤΒΤ.



? : Άγνωστα μονοπάτια

Σχήμα 1.4 : Μεταβολικές διαβάσεις τις οποίες πρότεινε ο Reemtsma (Reemtsma, 1995).

Έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες για την αποικοδόμηση των βενζοθειαζολίων. Στον Πίνακα 1.6 παρατίθενται τα αποτελέσματα αυτών των μελετών. Με (+) συμβολίζονται οι ενώσεις που αποικοδομούνται ενώ με (-) αυτές που δεν αποικοδομούνται.

Πίνακας 1.6 : Αποτελέσματα αποικοδόμησης βενζοθειαζολίων κάτω από αερόβιες συνθήκες (Kirouani-Harani, 2003)

Συγγραφείς	BTSA	BT	OHBT	MBT	ABT	TCMTB
De Wever et al. (1998)	+	+	+	-		
Chudoba (1977), Reprika (1983)	-	+	+	-	-	
Mainprize (1977)	-	-	+	-		
De Vos et al. (1993)	+	+				
Mainprize et al. (1976)	+					
Gaja and Knapp (1997, 1998)	+	+	+			
Reddy and Quinn (1997)	+	+				
Reemstma et al. (1995), De Wever (1992)	+	+				
Karelóná and Tomasovikóná (1988)	+					
Perraud et al. (1995), Reemstma et al. (1995)	+					

(+) : Αποικοδόμηση της ένωσης

(-) : Δεν αποικοδομείται

Παρατηρείται (Πίνακας 1.6) πως η διαδικασία βιοδιάσπασης των βενζοθειαζολίων είναι κατά ένα μεγάλο μέρος άγνωστη. Αν και μερικές από αυτές τις ενώσεις αποδομούνται σε ενεργή ιλύ, τα περισσότερα από τα δεδομένα όσον αφορά τα μονοπάτια σχετικά με τη βιοαποικοδόμηση των βενζοθειαζολίων που λαμβάνονται στο εργαστήριο είναι αναποτελεσματικά.

Αναερόβιοι μετασχηματισμοί των βενζοθειαζολίων

Η κατανόηση και η εφαρμογή της αναερόβιας επεξεργασίας τα προηγούμενα 30 έτη, δημιούργησαν σημαντικά οφέλη. Η πολυπλοκότητα της αναερόβιας επεξεργασίας και η λιγότερη εμπειρία της διαδικασίας έναντι της αερόβιας, είναι οι λόγοι για τις παραλλαγές μεταξύ μαθηματικών μοντέλων που προτείνουν οι επιστήμονες. Είναι σημαντικό να καθοριστεί η ευαισθησία της χημικής ουσίας στην αναερόβια βιοδιάσπαση ώστε να πραγματοποιηθεί περιβαλλοντική αξιολόγηση του κινδύνου της συγκεκριμένης ουσίας.

Το 1979 ο Owín παρείχε την πρώτη περιγραφή μιας τέτοιας μεθόδου, η οποία βασίστηκε στην μέτρηση της περίσσειας του όγκου αερίου ($\text{CH}_4 + \text{CO}_2$) που παρήχθη μετά την προσθήκη μιας χημικής ουσίας σε έναν αναερόβιο σπόρο που επωάστηκε στα σφραγισμένα μπουκάλια. Ο όγκος αερίου μετρήθηκε από την μετατόπιση του εμβόλου σε μια σύριγγα της οποίας η βελόνα ήταν στο μπουκάλι.

Στη συνέχεια, η μέθοδος αυτή βελτιστοποιήθηκε και ο De Wever και άλλοι (1998) απέδειξαν πως κάτω από αναερόβιες συνθήκες, οι συγκεντρώσεις του BT, MBT και

ΟΗΒΤ παρέμειναν σταθερές. Μια σύνοψη της έρευνας για την αερόβια και αναερόβια αποικοδόμηση μερικών βενζοθειαζολίων παρατίθεται στον Πίνακα 1.7.

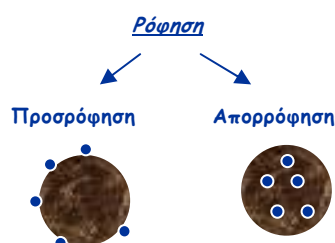
Πίνακας 1.7 : Αερόβιες και αναερόβιες δοκιμές αποικοδόμησης μερικών βενζοθειαζολίων σε υδάτινο περιβάλλον (Kirouani-Harani, 2003)

Συγγραφείς	Έτος	Σύστημα	Δοκιμές	Αποτελέσματα
Karelóna και Tomasovicóna	1988	Υδατικό περιβάλλον	Αναερόβια αποικοδόμηση	44 % και 74 % των αντίστοιχων 5 µg/L και 10 µg/L του ΜΒΤ έχουν αποικοδομηθεί μετά από 5 εβδομάδες
Γαja και Knapp	1998	Βιομηχανική ιλύς	Μικροβιακή αποικοδόμηση	Κανένα στοιχείο για την αποικοδόμηση του ΜΒΤ
De Wever κ.α.	1997	Ενεργή ιλύς	Αερόβια αποικοδόμηση	Το ΜΒΤ δεν ήταν βακτηριοκτόνο αλλά μάλλον ήταν βακτηριοστατικό
De Wever κ.α.	1993	Ενεργή ιλύς	Τοξικότητα/αποικοδόμηση	Η ενεργοποιημένη ιλύς μπορεί να διαχειρήθηκε από το ΜΒΤ (100 mg/L) ΜΒΤ→αποικοδόμηση
De Wever κ.α.	1994	Ενεργή ιλύς	Αποικοδόμηση	Η ιλύς η οποία περιείχε ΜΒΤ παρουσίασε μια τάση να συσσωρεύει ΒΤSO ₃ ως ένα πρώτο προϊόν αποικοδόμησης του ΜΒΤ
Γαja και Knapp	1997	Μολυσμένο νερό ποταμού	Μικροβιακή αποικοδόμηση	ΑΒΤ/ ΒΤ/ ΟΗΒΤ→ αμμωνία+θειικό άλας Το ΑΒΤ και το ΒΤ δεν αποικοδομούνται σε ρυπασμένο νερό ποταμού
Knapp και Callely	1976	Εκροές σε βιμηχανίες	Μικροβιακή αποικοδόμηση	ΒΤSA→ NH ₄ ⁺ + SO ₄ ⁻ ολοκληρωμένη βιοαποικοδόμηση
Karelóna και Tomasovicóna	1988	Υδατικό περιβάλλον	Αναερόβια αποικοδόμηση	ΜΒΤ μερικώς αποικοδομήσιμη
De Wever κ.α.	1998	Απόβλητα	Αναερόβια/αερόβια αποικοδόμηση	ΒΤSA→ ΟΒΤ (αναερόβια) ΒΤ→ ΟΗΒΤ και διυδρόγενο-ΒΤ ενδιάμεσος (αερόβια)
De Vos κ.α.	1993	Ενεργή ιλύς	Τοξικότητα και αποικοδόμηση	ΜΒΤ → ΜΒΤS /ΒΤSO ₃
Reemtsma κ.α.	1995	Νερό βιμηχανίας	Αναερόβια/αερόβια μικροβιακή αποικοδόμηση	ΤCΜΤB→ΜΒΤ→ΜΤΒΤ (αερόβια) ΒΤ: αποικοδόμηση ΜΒΤ→ΒΤ + ΟΗΒΤ + μη αναγνωρισμένο προϊόν
Brownlee κ.α.	1992	Φυσικό νερό	Φωτοαποικοδόμηση	ΤCΜΤB→ ΜΒΤ→ ΒΤ ΜΤΒΤ σταθερή

1.2 Προσρόφηση βενζοθειαζολίων σε αιωρούμενα σωματίδια στο νερό

Η διεργασία κατά την οποία μια χημική ένωση συνδέεται σε μια στερεή φάση ονομάζεται γενικά ρόφηση (προσρόφηση σε μια επιφάνεια, είτε απορρόφηση σε τρισδιάστατο σώμα). Είναι ιδιαίτερα σημαντική γιατί επηρεάζει δραματικά το γίνεσθαι και τις ιδιότητες της χημικής ένωσης στο περιβάλλον (Στεφάνου, 2006).

Φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις, διαφόρων τύπων, είναι υπεύθυνες για την σύνδεση μίας χημικής ένωσης (που καλείται προσροφούμενη ουσία – sorbate) με κάποιο στερεό (που καλείται προσροφητής – sorbent). Έτσι, οι οργανικές ενώσεις και συγκεκριμένα τα βενζοθειαζόλια, μπορούν να διαφύγουν από το νερό προσροφούμενες στην αιωρούμενη οργανική ύλη, ή να συνδεθούν με την επιφάνεια του στερεού με διαμοριακές δυνάμεις τύπου van der Waals, διπόλου-διπόλου ή άλλου είδους μη ισχυρές διαμοριακές δυνάμεις. Αν η χημική ένωση μπορεί να ιονιστεί τότε μπορεί να συνδεθεί στις θέσεις της στερεάς επιφάνειας που έχουν αντίθετο φορτίο. Τέλος είναι δυνατόν να δημιουργηθεί κάποιου είδους χημικός δεσμός με την επιφάνεια του στερεού. Οι προαναφερόμενες διαφορετικές αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν και το ποια κυριαρχεί εξαρτάται από την δομή της ένωσης και την φύση του στερεού (Στεφάνου, 2006). Στο Σχήμα 1.5 απεικονίζεται το φαινόμενο της προσρόφησης και της απορρόφησης.



Σχήμα 1.5 : Προσρόφηση και απορρόφηση ενώσεων σε στερεό υπόστρωμα

Η ικανότητα ενός στερεού να προσροφά ενώσεις από ένα διάλυμα είναι συνάρτηση και της συγκέντρωσης της ένωσης αυτής στο υδατικό διάλυμα. Για τα βενζοθειαζόλια δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για την προσρόφησή τους στη σωματιδιακή φάση, όμως όταν υπάρχει υψηλή αναλογία οργανικού υλικού τότε αυξάνεται και το ποσοστό της προσρόφησης. Η άμεση εξάρτηση της έκτασης του φαινομένου από την οργανική ύλη του προσροφητή δείχνει ότι η εν λόγω διεργασία προκύπτει από τη μετάβαση κατά ένα ποσοστό της ουσίας από το διάλυμα σε οργανική φάση στην επιφάνεια ή εντός των σωματιδίων.

Γενικά η έκταση προσρόφησης ενός χημικού προϊόντος σε περιβαλλοντικές συνθήκες καθορίζεται από διάφορες φυσικές και χημικές ιδιότητες του προσροφητή αλλά και του προσροφούμενου. Η τάση προσρόφησης των διαφόρων χημικών ενώσεων μπορεί να εκφραστεί από μία παράμετρο τον **συντελεστή προσρόφησης K_{oc}** . Ο συντελεστής αυτός είναι το μέτρο της κατανομής μίας χημικής ένωσης ανάμεσα στο στερεό και στην υδατική φάση και είναι ανεξάρτητος των ιδιοτήτων του εδάφους και του ιζήματος (Στεφάνου, 2006).

Ο συντελεστής K_{oc} ορίζεται ως ο λόγος του προσροφηθέντος χημικού προϊόντος ανά βάρος οργανικού άνθρακα προς την συγκέντρωση του χημικού προϊόντος στο υδατικό διάλυμα (Στεφάνου, 2006).

1.2.1 Μηχανισμοί προσρόφησης

Υπάρχουν τρία είδη προσρόφησης: *φυσική, χημική και προσρόφηση ανταλλαγής*. Η φυσική προσρόφηση (physical adsorption) παρατηρείται σε ευρύ φάσμα ρύπων (και ως εκ τούτου αποκαλείται nonspecific), οφείλεται δε στην επίδραση αδύνατων ελκτικών δυνάμεων ή δυνάμεων van der Waals μεταξύ μορίων. Τα μόρια που προσροφούνται δεν προσαρτιούνται σε ένα συγκεκριμένο σημείο της επιφάνειας αλλά κινούνται ελεύθερα πάνω σε αυτή. Το υλικό που προσροφάται μπορεί να εμφανίσει συμπυκνωμένη διάταξη έτσι ώστε να σχηματισθούν μοριακές στρώσεις που επικάθονται η μια πάνω στην άλλη. Η φυσική προσρόφηση είναι αντιστρέψιμη: μόλις μειωθεί η συγκέντρωση της προσροφημένης ουσίας στο υδατικό διάλυμα, τα προσροφημένα μόρια εγκαταλείπουν την επιφάνεια πάνω στην οποία έχουν συγκεντρωθεί και επιστρέφουν στην υδατική διάλυση (το φαινόμενο αυτό, που είναι αντίθετο της προσρόφησης, ονομάζεται desorption).

Η χημική προσρόφηση (chemical adsorption) προκαλείται από πολύ ισχυρότερες δυνάμεις, ανάλογες με αυτές που οδηγούν στο σχηματισμό χημικών ενώσεων. Η ουσία που προσροφάται σχηματίζει στρώμα πάχους ενός μόνο μορίου πάνω στην στερεή επιφάνεια του προσροφητή, τα δε προσροφημένα μόρια δεν είναι ελεύθερα να κινηθούν πάνω στην επιφάνεια αυτή. Επομένως, μόλις η επιφάνεια του στερεού προσροφητή καλυφθεί πλήρως το μονομοριακό στρώμα της προσροφούμενης ουσίας, το φαινόμενο της προσρόφησης σταματά, λέγεται δε ότι η ικανότητα για προσρόφηση εξαντλείται. Σε αντίθεση με την φυσική προσρόφηση, υπό κανονικές συνθήκες η χημική προσρόφηση δεν είναι αντιστρεπτή διαδικασία· για την αποπροσρόφηση (desorption) απαιτείται αύξηση της θερμοκρασίας της επιφάνειας του προσροφητή.

Η προσρόφηση ανταλλαγής (exchange adsorption) χαρακτηρίζεται από ελκτικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ των μορίων της προσροφούμενης ουσίας και της στερεάς επιφάνειας του προσροφητή. Η αποκαλούμενη ανταλλαγή ιόντων (ion exchange) αποτελεί το πιο συνηθισμένο είδος προσρόφησης ανταλλαγής. Τα ιόντα της εν διαλύσει ουσίας συγκεντρώνονται στην επιφάνεια του προσροφητή σαν αποτέλεσμα ηλεκτροστατικής έλξης μεταξύ αυτών και σημείων της επιφάνειας που έχουν αντίθετο ηλεκτρικό φορτίο. Όπως είναι αναμενόμενο, τα πολυσθενή ιόντα που χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο ηλεκτρικό φορτίο (σθένος) έλκονται σε αντίθετα φορτισμένα σημεία της επιφάνειας του προσροφητή περισσότερο από ιόντα με μικρότερο σθένος. Επίσης, όσο μικρότερο είναι το μέγεθος του (ένυδρου) ιόντος (συμπεριλαμβανομένων δηλαδή τυχόν μορίων νερού που περιβάλλουν το ιόν), τόσο μεγαλύτερη η ελκτική δύναμη που παρατηρείται.

Σημειώνεται ότι η χρήση του όρου sorption γίνεται ώστε να περιλαμβάνονται τα φαινόμενα της απορρόφησης (absorption) και της προσρόφησης (adsorption). Συχνά, ο όρος sorption χρησιμοποιείται για αναφορά σε χημικής μορφής απορρόφηση, ο δε όρος adsorption για αναφορά σε φυσική προσρόφηση.

Η προσρόφηση επιτελείται σε τρία στάδια : μακροσκοπική μεταφορά (macrotransport), μικροσκοπική μεταφορά (microtransport) και προσρόφηση στην επιφάνεια του στερεού προσροφητή.

1. Κατά το στάδιο της μακροσκοπικής μεταφοράς, η διαλυμένη ουσία μετακινείται μέσα από τον διαλύτη προς την ζώνη διασύνδεσης στερεού-υγρού μέσω της μηχανισμών της υδροδυναμικής μεταφοράς (advection) και της διάχυσης (diffusion).

2. Στο επόμενο στάδιο της μικροσκοπικής μεταφοράς, η εν διαλύσει ουσία διεισδύει μέσα στο πορώδες των στερεών κόκκων με τον μηχανισμό της διάχυσης. Το δαιδαλώδες σύστημα του πορώδους αποτελείται από μεγαλύτερους (macropores και mesopores) και μικρότερους (micropores και submicropores) πόρους.

Τελικά, επιτελείται η προσρόφηση της διαλυμένης ουσίας, λόγω δε της κατά πολύ μεγαλύτερης επιφάνειας των μικρότερων πόρων, η προσρόφηση συμβαίνει ως επί το πλείστον σε επιφάνειες των μικρότερων πόρων.

Όταν η ταχύτητα εκρόφησης (desorption) γίνει ίση με την ταχύτητα της προσρόφησης, επικρατούν συνθήκες ισορροπίας και εξαντλείται η ικανότητα του στερεού να προσροφήσει την διαλυμένη ουσία. Η θεωρητική ικανότητα προσρόφησης μπορεί να προσδιορισθεί με μαθηματικά μοντέλα του φαινομένου της προσρόφησης που αποκαλούνται ισόθερμες.

1.2.2 Ισόθερμα προσρόφησης

Το μέγεθος της προσρόφησης μιας ένωσης είναι σημαντικό για την κινητικότητα της, την πτητικότητα της, την υδρόλυση της, την φωτόλυση της και την βιοαποδόμηση της.

Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για την μέτρηση των συντελεστών K_{oc} είναι μέσω του προσδιορισμού των ισόθερμων προσρόφησης. Ως ισόθερμη καμπύλη προσρόφησης χαρακτηρίζεται η γραφική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ της ποσότητας της χημικής ένωσης που έχει προσροφηθεί ανά μονάδα βάρους προσροφητή και της συγκέντρωσης της στο διάλυμα σε κατάσταση ισορροπίας.

Έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες για να αποδοθούν θεωρητικά μοντέλα που να προβλέπουν ισόθερμες όπως i) του Freundlich, ii) του Langmuir, iii) του Temkin, iv) των Brunauer-Emmett-Teller (BET) και v) του γραμμικού.

Το πιο απλό μοντέλο είναι το γραμμικό Stern-Graham, σύμφωνα με το οποίο η προσροφημένη ποσότητα είναι ανάλογη με την διαλυτή ποσότητα. Η σχέση η οποία διέπει αυτό το μοντέλο είναι :

$$C_s = K_D \cdot C_w$$

όπου K_D : συντελεστής κατανομής

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)

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. 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.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το γραμμικό μοντέλο ισόθερμων στα αιωρούμενα στερεά αφού οι συγκεντρώσεις των βενζοθειαζολίων στα διαλύματα ήταν μικρές (0,01-3,92 μg/L) (βλ. Κεφ.5, §5.6).

1.3 Διαδικασίες επεξεργασίας αστικών υγρών αποβλήτων

Η επεξεργασία των αστικών λυμάτων γίνεται με ένα συνδυασμό φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών. Αυτές οι διαδικασίες περιλαμβάνουν διάφορα στάδια όπως την προεπεξεργασία, την πρωτοβάθμια, δευτεροβάθμια και τριτοβάθμια επεξεργασία, την απολύμανση και την επεξεργασία της ιλύος (Λυμπεράτος, 1999).

Προεπεξεργασία

Στόχος της προεπεξεργασίας των αστικών λυμάτων είναι η προστασία των επόμενων διεργασιών και περιλαμβάνει φυσικές διεργασίες (Εσχαρισμός, Άλεση/ πολτοποίηση, Εξάμμωση, Λιποσυλλογή, Εξισορρόπηση της παροχής).

Πρωτοβάθμια επεξεργασία

Στόχος της πρωτοβάθμιας επεξεργασίας είναι η απομάκρυνση των στερεών. Οι κύριες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι: η Πρωτοβάθμια καθίζηση, η Επίπλευση και η Χημική Κατακρήμνιση.

Δευτεροβάθμια επεξεργασία

Σκοπός της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας είναι η απομάκρυνση του οργανικού φορτίου με βιολογικές διαδικασίες. Αυτές οι διεργασίες λαμβάνουν χώρα σε εναιωρήματα (ενεργός ιλύς, λίμνες) ή είναι σε ετερογενείς (σε βιολογικά φίλτρα και βιοδίσκους).

Τριτοβάθμια επεξεργασία

Στόχος αυτής της διεργασίας είναι η απομάκρυνση των ρυπαντών που διαφεύγουν από τις προηγούμενες διεργασίες, όπως αιωρούμενα στερεά (διύλιση, μικροδιήθηση, επίπλευση, χημική κατακρήμνιση), οργανικές ενώσεις (προσρόφηση σε ενεργό άνθρακα, παρατεταμένη βιολογική οξειδωση) και θρεπτικά συστατικά όπως ο φωσφόρος (βιολογική αφομοίωση, βιολογική/ χημική κατακρήμνιση, χημική κατακρήμνιση, ενεργός άνθρακας, άρδευση) και το άζωτο (βιολογική νιτροποίηση-απονιτροποίηση, αφαίρεση αμμωνίας με αερισμό, οξειδωση αμμωνίας με χλώριο, αφαίρεση αμμωνίας με ιοντο-ανταλλαγή, βιολογική αφομοίωση, άρδευση). Ειδικότερα κατά τη διάρκεια της απομάκρυνσης του αζώτου με την βιολογική διεργασία της νιτροποίησης και απονιτροποίησης, παράγονται σαν ενδιάμεσα προϊόντα αέριες αζωτούχες ενώσεις (N_2O και NO_x).

Απολύμανση

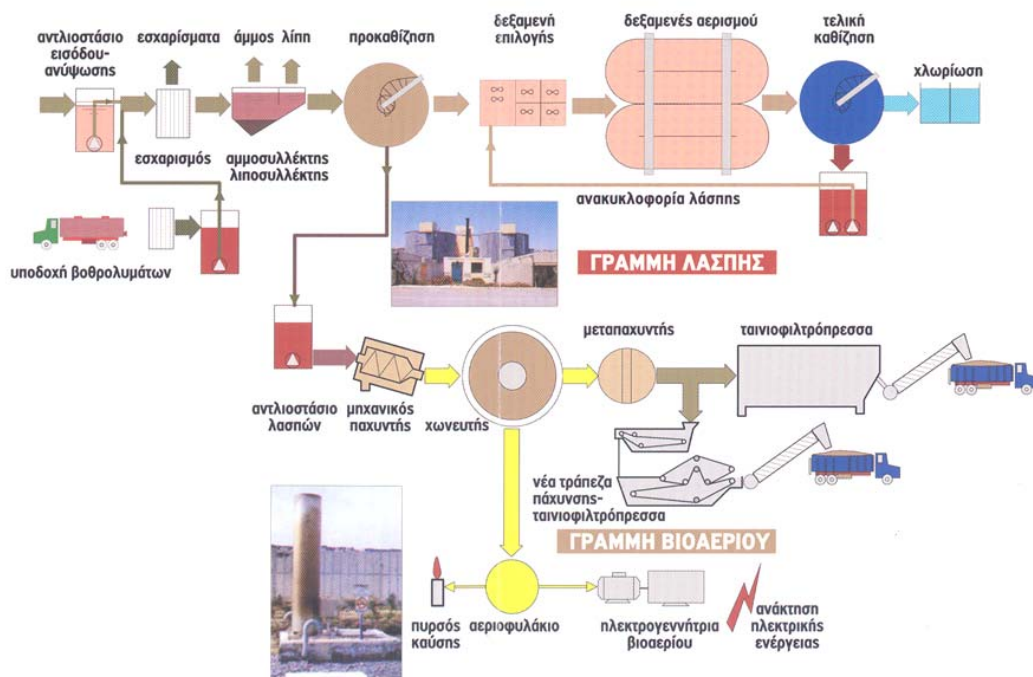
Στόχος της απολύμανσης είναι η καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών. Διακρίνεται στις παρακάτω κατηγορίες : Χημική απολύμανση : με χρήση χλωρίου, όζοντος , βρωμίου και Φυσική απολύμανση με ακτινοβολία UV ή θερμότητα.

Επεξεργασία ιλύος

Η διεργασία αυτή έχει σαν στόχο την ελάττωση του όγκου της λάσπης με απομάκρυνση νερού και την αποδόμηση των οργανικών ενώσεων που προκαλούν δυσοσμία.

1.3.1 Διαδικασία επεξεργασίας λυμάτων στον βιολογικό σταθμό Ηρακλείου

Η μονάδα επεξεργασία λυμάτων του Ηρακλείου είναι μια σύγχρονη τυπική εγκατάσταση διεργασίας ενεργού ιλύος. Η εγκατάσταση αποτελείται από δύο κεντρικά συστήματα τα οποία λειτουργούν παράλληλα: της ενεργούς ιλύος όπου πραγματοποιείται η βασική επεξεργασία των υγρών αποβλήτων και της αναερόβιας χώνευσης όπου σταθεροποιείται η παραγόμενη λάσπη. Πλήρης αναπαράσταση της μονάδας επεξεργασίας υγρών αποβλήτων δίνεται στο Σχήμα 1.6. Στην παρούσα εργασία θα γίνει λόγος μόνο για τη γραμμή υγρών, αφού οι δειγματοληψίες αφορούσαν μόνο τα υγρά απόβλητα.



Σχήμα 1.6 : Διάγραμμα ροής εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων περιοχής Ηρακλείου (Δημοτική Επιχείρηση Ύδρευσης Αποχέτευσης Ηρακλείου)

Γραμμή Υγρών

Από το αντλιοστάσιο εισόδου (Σχήμα 1.6) εισέρχεται το 94% περίπου των συνολικών ακατέργαστων λυμάτων το οποίο απαρτίζεται από αστικά απόβλητα. Το υπόλοιπο 6% αποτελείται από βοθρολύματα τα οποία αρχικά συγκεντρώνονται σε δύο δεξαμενές 700 m³ η καθεμιά. Τα βοθρολύματα οδηγούνται στο κτήριο των μηχανικών σαφρών στην είσοδο του όποιου αναμιγνύονται με τα αστικά λύματα. Η παροχή των βοθρολυμάτων θα πρέπει να επισημανθεί ότι πραγματοποιείται για περίπου 12 ώρες, από τις 7:00 έως τις 19:00, και χαρακτηρίζεται από ασυνεχή ροή. Ο καθαρός χρόνος της ροής τους εκτιμάται σε περίπου 6 ώρες.

Τα λύματα στη συνέχεια εισάγονται στη μονάδα αμμοσυλλογής και λιπосуλλογής (Σχήμα 1.6) η οποία αποτελείται από δύο παράλληλες υπομονάδες συνολικού όγκου 300 m³.

Μέσω του διαύλου *Parshall* τα απόβλητα οδηγούνται στις Δεξαμενές Α΄ Καθίζησης. Σημειώνεται ότι από τις δύο δεξαμενές, χωρητικότητας 3000 m³ η καθεμιά, λειτουργεί μόνο η μία η οποία καλύπτει τις ανάγκες της εγκατάστασης.

Το επόμενο στάδιο επεξεργασίας είναι οι Δεξαμενές Αερισμού (Σχήμα 1.6). Τέσσερις δεξαμενές συνολικού όγκου 10000 m³ απαρτίζουν δύο υποσυστήματα όπου παράλληλα με τη βιολογική οξειδωση των οργανικών (διεργασία της ενεργούς ιλύος) πραγματοποιείται πλήρης νιτροποίηση και απονιτροποίηση. Η τελευταίες διεργασίες επιτυγχάνονται με εναλλασσόμενη οξική και ανοξική λειτουργία των δεξαμενών αερισμού. Σε αυτό το στάδιο επεξεργασίας τα λύματα παραμένουν κατά μέσο όρο για 10 h.

Τα υγρά απόβλητα στη συνέχεια συγκεντρώνονται στις Δεξαμενές Β΄ Καθίζησης (Σχήμα 1.6). Πρόκειται για δύο κυκλικές δεξαμενές όμοιες με αυτές της Α΄ Καθίζησης χωρητικότητας 4000 m³ η καθεμιά στις οποίες ο μέσος υδραυλικός χρόνος παραμονής φθάνει τις 8 h. Στην απορροή των Δευτεροβάθμιων Δεξαμενών εισάγεται χλώριο προκειμένου να εξουδετερωθούν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί.

1.4 Αντικείμενο και στόχοι της παρούσας διατριβής

Τα βενζοθειαζόλια είναι μια από τις σημαντικότερες αναδυόμενες κατηγορίες ρυπογόνων χημικών ουσιών και έχουν παγκόσμιο ενδιαφέρον αφού ενδέχεται να προκαλούν σοβαρή περιβαλλοντική ρύπανση. Τα βενζοθειαζόλια εφαρμόζονται όλο και περισσότερο στη βιομηχανία και εξαιτίας των ποικίλων εφαρμογών τους, παράγονται και χρησιμοποιούνται σε μεγάλες ποσότητες σε πολλές χώρες.

Ο βασικός σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας ιδιαίτερα ευαίσθητης και επιλεκτικής μεθόδου για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τους σε υδατικά δείγματα, εμπορικά και βιομηχανικά προϊόντα.

Αναλυτικότερα, οι επιμέρους στόχοι της εργασίας αυτής ήταν :

- Να αναπτυχθεί μια ιδιαίτερα ευαίσθητη κι επιλεκτική μέθοδος για την ανάλυση των βενζοθειαζολίων, η οποία να βασίζεται στη χρήση συνδυασμού υγρής χρωματογραφίας, ηλεκτροψεκασμού, διαδοχικής φασματομετρίας μαζών (HPLC-ES-MS/MS).
- Να προσδιοριστούν οι βέλτιστες τιμές, στις οποίες θα πρέπει να ρυθμίζονται οι διάφορες λειτουργικές παράμετροι των οργάνων (HPLC-UV, HPLC-ES-MS/MS).
- Να ερευνηθούν οι δυνατότητες της διαδοχικής φασματομετρίας μάζας για την ανίχνευση βενζοθειαζολίων με εφαρμογή διαφόρων συνδυαστικών σαρώσεων. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων (SRM).
- Να βρεθεί κατάλληλη μέθοδος επεξεργασίας των δειγμάτων, να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες που εφαρμόζονται στην εκχύλιση στερεάς φάσης, καθώς και στη συνεχή εκχύλιση (βλ. Κεφ. 2, § 2.3, 2.4, 2.5) και να προσδιοριστεί η ανάκτηση με διαφορετικές ροές στη διάταξη πολλών μικροστηλών.
- Να πραγματοποιηθούν πειράματα ανάκτησης των βενζοθειαζολίων στη διαλυτή και στη σωματιδιακή φάση υδατικών δειγμάτων.
- Να ελεγχθεί η ύπαρξη παρεμπόδισης μήτρας για τον ακριβή προσδιορισμό των βενζοθειαζολίων στα δείγματα τα οποία μελετήθηκαν και να πραγματοποιηθεί στατιστικός έλεγχος ώστε να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα για την παρεμπόδιση μήτρας.
- Να εφαρμοστεί η αναλυτική μέθοδος για την ανάλυση δειγμάτων διαλυτής και σωματιδιακής φάσης τα οποία προέρχονταν τόσο από δείγματα του σταθμού βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων, όσο και από νερά απορροής δρόμων, ελαστικά και εμπορικά προϊόντα (calgonit, calgon, αντιψυκτικό αυτοκινήτου).

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦ 2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ

2.1 Αντιδραστήρια

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ενώσεις : Βενζοθειαζόλιο (BT) 96+%, 6-καρβόξυλοβενζοθειαζόλιο (BTCA) 96%, 2-υδρόξυβενζοθειαζόλιο (OHBT) 98% και 2-μεθυλθιοβενζοθειαζόλιο (MTBT) 97% από την εταιρεία Aldrich. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν οι 2-μερκαπτοβενζοθειαζόλιο (MBT)≥99% και 2-αμινοβενζοθειαζόλιο (ABT)≥98% από την εταιρεία Fluka καθώς και η L-γλουταθειόνη (GSH)≥98% στην ανηγμένη της μορφή από την Sigma.

Στην κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη 99% από την εταιρία Riedel de Haen, απιονισμένο νερό (nanopure) καθώς και οξικό οξύ 100% της Merck.

2.2 Δειγματοληψία

Ως δειγματοληψία ορίζεται η διαδικασία επιλογής, συλλογής, διατήρησης και μεταφοράς προς ανάλυση, μιας ενδεικτικής 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.

Πριν τη δειγματοληψία, μελετάται το υλικό που πρόκειται να αναλυθεί, καθορίζονται οι απαιτούμενοι προσδιορισμοί και επιλέγονται οι ποσότητες που θα χρησιμοποιηθούν ως δείγμα. Το δείγμα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό του αρχικού υλικού. Η αντιπροσωπευτικότητα εξασφαλίζεται με επιλογή κατάλληλων σημείων και του χρόνου δειγματοληψίας καθώς και τη διατήρηση αναλλοίωτου του δείγματος μέχρι την έναρξη της ανάλυσης.

Υπάρχουν τρεις τύποι δειγμάτων : A) *Στιγμιαία δείγματα* : Με τον όρο «στιγμιαία δείγματα» νοούνται τα δείγματα που συλλέγονται σε μια ορισμένη ώρα και θέση και αντιπροσωπεύουν τη συγκεκριμένη σύνθεση της πηγής, τη στιγμή της δειγματοληψίας. B) *Σύνθετα δείγματα* : Στις περισσότερες περιπτώσεις ο όρος «σύνθετα δείγματα» αναφέρεται στη συλλογή και ανάμιξη ορισμένης ποσότητας στιγμιαίων δειγμάτων που

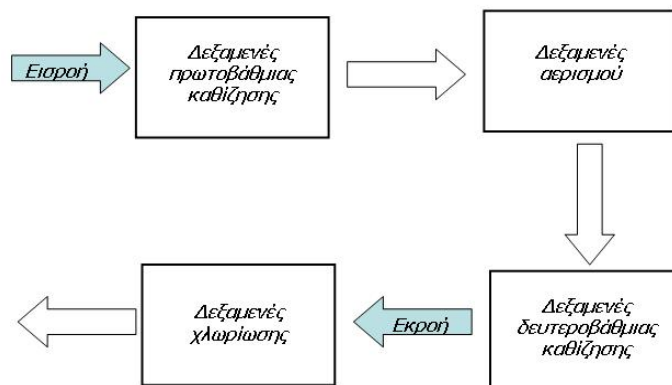
έχουν συλλεγεί από το ίδιο σημείο σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Συλλέγονται συνήθως σε 24ωρη βάση ανά 1 ή 2 ώρες. Γ) *Ολοκληρωμένα δείγματα* : Με τον όρο «ολοκληρωμένα δείγματα» νοείται η συλλογή και ανάμιξη δειγμάτων που έχουν συλλεγεί την ίδια χρονική στιγμή από διαφορετικά σημεία (Ζανάκη, 2001).

Στην παρούσα εργασία τα δείγματα ήταν σύνθετα και συλλέχθηκαν από τη Μονάδα Επεξεργασίας Λυμάτων που βρίσκεται στην περιοχή Φοινικιά του νομού Ηρακλείου. Ο Βιολογικός Καθαρισμός Ηρακλείου είναι σήμερα μία από τις μεγαλύτερες εγκαταστάσεις καθαρισμού λυμάτων στην Ελλάδα και ίσως η πιο σύγχρονη στο Μεσογειακό χώρο. Εντάσσεται μέσα στο σχέδιο ολοκληρωμένης διαχείρισης λυμάτων της ευρύτερης περιοχής Ηρακλείου που περιλαμβάνει :

- χωριστικούς κεντρικούς και δευτερεύοντες αποχετευτικούς αγωγούς και αντλιοστάσια
- το Βιολογικό Καθαρισμό (ΒΚ) Ηρακλείου και
- τον αγωγό διάθεσης της εκροής (χερσαίο και υποθαλάσσιο)

Ο ΒΚ Ηρακλείου μπορεί να δεχθεί λύματα και βοθρολύματα της ευρύτερης περιοχής των Δήμων Ηρακλείου, Ν. Αλικαρνασσού και Γαζίου. Μπορεί να επεξεργάζεται τα λύματα 164.000 ισοδύναμων κατοίκων περίπου (λύματα μέχρι 30.500 κ.μ./ημέρα και βοθρολύματα μέχρι 1.500 κ.μ./ημέρα). Σήμερα λειτουργεί με ημερήσια παροχή 24.000 κ.μ./ημέρα υγρών αποβλήτων εκ των οποίων τα 1.500 κ.μ./ημέρα είναι βοθρολύματα (<http://www.deyah.gr/biologic.htm>).

Η δειγματοληψία αφορούσε συγκεκριμένα στάδια της βιολογικής επεξεργασίας κι έγινε λήψη συγκεκριμένου όγκου και ποσότητας δειγμάτων (Πίνακας 2.1). Συλλέχθηκαν δείγματα από δύο στάδια : α) την εισροή, πριν από οποιαδήποτε επεξεργασία και β) την εκροή πριν το τελικό στάδιο της χλωρίωσης και μετά τη δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης (Σχήμα 2.1).



Σχήμα 2.1 : Θέσεις δειγματοληψίας στην εισροή και στην εκροή πριν το στάδιο χλωρίωσης στο βιολογικό καθαρισμό Ηρακλείου.

Πίνακας 2.1 : Συνοπτική παρουσίαση δειγματοληψιών από το βιολογικό καθαρισμό Ηρακλείου

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΕΣ	ΣΗΜΕΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	ΩΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	ΟΓΚΟΣ (mL)	ΣΧΟΛΙΑ
4/11/2005	Εισροή	12.00	500	Ποιοτικός έλεγχος
7/12/2005	Εισροή	12.00	1500	Ποιοτικός έλεγχος
23/1/2006	Εισροή Εκροή	8.30-14.30	1050	Ποσοτικός προσδιορισμός. (Προσθήκη GSH μόνο στη σωματιδιακή φάση)
		15.30-21.30	1050	
		22.30-4.30	1050	
		5.30-7.30	1050	
1/2/2006	Εισροή	14.30-15.30	1000	Ποσοτικός προσδιορισμός. (Προσθήκη GSH μόνο στη σωματιδιακή φάση)
8/2/2006	Εισροή	14.00-15.00	1500	Ποσοτικός προσδιορισμός. (Προσθήκη GSH μόνο στη σωματιδιακή φάση)
	Εκροή	14.00-15.00	1500	
13/2/2006	Εισροή	14.00-15.00	1500	Ποσοτικός προσδιορισμός. (Προσθήκη GSH μόνο στη σωματιδιακή φάση)
	Εκροή	14.00-15.00	1500	
11/9/2006	Εισροή	13.00-14.00	700	Ποσοτικός προσδιορισμός. (Προσθήκη GSH πριν από κάθε επεξεργασία)
	Εκροή	13.00-15.00	700	
13/9/2006	Εισροή	13.00-14.00	700	Ποσοτικός προσδιορισμός. (Προσθήκη GSH πριν από κάθε επεξεργασία)
14/9/2006	Εισροή	11.00	700	Ποσοτικός προσδιορισμός. (Προσθήκη GSH πριν από κάθε επεξεργασία)
	Εκροή	10.30	700	

GSH : γλουταθειόνη (βλ. Κεφ.3, §3.7)

Επιπλέον, εκτός από τα δείγματα του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου, αναλύθηκαν και μια σειρά από άλλα δείγματα τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2, με σκοπό

να διερευνηθεί η προέλευση των βενζοθειαζολίων καθώς και το πως τελικά αυτές καταλήγουν στο βιολογικό καθαρισμό και κατ' επέκταση στο περιβάλλον.

Πίνακας 2.2 : Εμπορικά προϊόντα τα οποία αναλύθηκαν για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των βενζοθειαζολίων.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ		
1.	Αντιψυκτικό αυτοκινήτου	
2.	Ελαστικά μέρη αυτοκινήτου	Ρόδα
3.		Σαμπρέλα
4.	Αποσκληρυντικό πλυντηρίου	(Calgon)
5.	Απορρυπαντικό πλυντηρίου	(Calgonit)
6.	Απορροή δρόμων (δύο δείγματα)	(Περιοχή Χερσονήσου)

2.3 Προεπεξεργασία δειγμάτων

Μετά το τέλος της δειγματοληψίας, το δείγμα μεταφέρεται στο εργαστήριο όπου προεπεξεργάζεται ώστε να είναι κατάλληλο για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων που μας ενδιαφέρουν. Το μερκαπτοβενζοθειαζόλιο (MBT) οξειδώνεται, συνεπώς εισάγεται στο δείγμα L-γλουταθειόνη στην ανηγμένη μορφή 0,1M (5mL GSH σε 250 mL δείγματος) για την αποφυγή της οξειδωσης της ένωσης. Στη συνέχεια το δείγμα διηθείται με χρήση φίλτρων διαφορετικής διαμέτρου των πόρων. Τρία διαφορετικά είδη φίλτρων χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία :

α. Φίλτρα ινών υάλου : 47 mm – 3.00 μm, της εταιρείας Pall

β. Φίλτρα ινών υάλου : 47 mm – 1.00 μm, της εταιρείας Pall

γ. Φίλτρα μεμβράνης από υδρόφιλο πολυπροπυλένιο : 47 mm – 0.45 μm, της εταιρείας Pall.

Με τη διαδικασία της διήθησης απομακρύνονται τα στερεά σωματίδια, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό βενζοθειαζολίων κατά τη σωματιδιακή φάση. Στη συνέχεια, το δείγμα φυλάσσεται στο ψυγείο έως ότου πραγματοποιηθεί η εκχύλιση στερεάς φάσης.

Για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των βενζοθειαζολίων στη σωματιδιακή φάση θα πρέπει αρχικά να γίνει υπολογισμός της μάζας του δείγματος. Αυτό

πραγματοποιείται έμμεσα από την διαφορά της μάζας των φίλτρων πριν και μετά την εναπόθεση σ' αυτά της σωματιδιακής φάσης. Τα φίλτρα που περιέχουν τη σωματιδιακή φάση τοποθετούνται στο φούρνο στους 100°C για να απομακρυνθεί τυχόν υγρασία για μία ώρα περίπου, στη συνέχεια στον ξηραντήρα και έπειτα ζυγίζονται. Όταν έχει υπολογιστεί η διαφορά μάζας το δείγμα με τα σωματίδια ακολουθεί τη διαδικασία της συνεχούς εκχύλισης (Soxhlet).

2.4 Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction)

Η τεχνική αυτή, που αντικατέστησε την κλασική εκχύλιση υγρού-υγρού, συνδυάζει τη δράση μιας στερεής και μιας υγρής φάσης και βασίζεται στο γεγονός ότι τόσο οι προσδιοριζόμενες ενώσεις όσο και οι παρεμποδίσσεις, που είναι διαλυμένες σε κάποιο υγρό, συγκρατούνται σε ένα ειδικό προσροφητικό υλικό που βρίσκεται σε μια μικροστήλη εκχύλισης. Η SPE χρησιμοποιείται συγκεκριμένα για:

- Απομάκρυνση παρεμποδίσεων και ενώσεων που μπορεί να καταστρέψουν τις αναλυτικές στήλες.
- Απομόνωση ή / και προσυγκέντρωση ιχνών της προσδιοριζόμενης ένωσης.
- Αφαλάτωση.
- Αλλαγή διαλύτη της προσδιοριζόμενης ένωσης, ώστε να είναι συμβατός με την χρησιμοποιούμενη μέθοδο HPLC.
- *In situ* παραγωγοποίηση

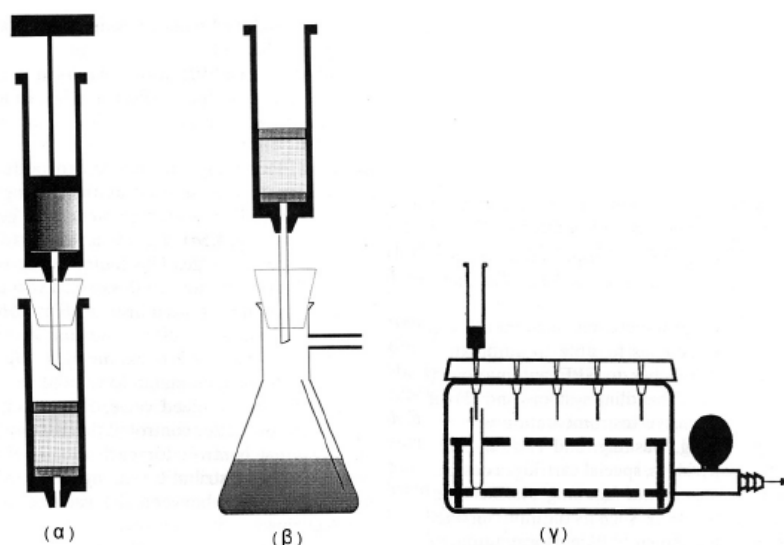
Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της SPE είναι :

- Η δυνατότητα συνύπαρξης δύο ή και περισσότερων μηχανισμών στη διαδικασία εκχύλισης (ιοντοανταλλαγή, προσρόφηση).
- Η δυνατότητα πραγματοποίησης πολλαπλών εκχυλίσεων του δείγματος με χρησιμοποίηση δύο ή περισσότερων μικροστηλών με το ίδιο ή διαφορετικό προσροφητικό υλικό σε σειρά. Εδώ είναι δυνατή η εφαρμογή διαφόρων μηχανισμών διαχωρισμού σε σειρά για την καλύτερη κλασμάτωση του δείγματος και τον αποτελεσματικότερο καθαρισμό του.
- Η δυνατότητα αυτοματοποίησης με όλα τα πλεονεκτήματα που απορρέουν: α) μεγαλύτερη ταχύτητα, β) καλύτερη επαναληψιμότητα και γ) ταυτόχρονη κατεργασία πολλών δειγμάτων.

- Η μεγάλη ακρίβεια και εκλεκτικότητα, ιδιαίτερα σε αναλύσεις μικρού όγκου, της τάξης των μL .
- Η απλότητα και η ευκολία στους χειρισμούς και η χρήση απλών και φθηνών διατάξεων.
- Η οικονομία στη χρήση διαλυτών.

Η SPE μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση: 1) Μικροστηλών (cartridges), 2) δίσκων (discs) και 3) ινών (fibers) για μικροεκχύλιση (Solid - Phase Microextraction, SPME). Οι μικροστήλες χρησιμοποιούνται πιο συχνά και είναι συνήθως από πολυπροπυλένιο, πολυαιθυλένιο ή γυαλί ελεύθερο προσμίξεων. Εάν υπάρχουν προσμίξεις όπως πλαστικοποιητές, σταθεροποιητές κ.ά., στο υλικό κατασκευής των μικροστηλών, τότε αυτές μπορεί να συνεχυλιστούν κατά την εκχύλιση και να μολύνουν το δείγμα. Το προσροφητικό υλικό, που είναι αντίστοιχο αυτού που χρησιμοποιείται στις αναλυτικές στήλες (π.χ. υλικά συζευγμένου διοξειδίου του πυριτίου, ιοντοανταλλακτικές ρητίνες, κ.ά.), τοποθετείται στις μικροστήλες, όπου συγκρατείται με φρίτες. Οι φρίτες είναι από πολυπροπυλένιο, PTFE ή ανοξείδωτο χάλυβα, με πορώδες 10 - 20 μm , ώστε να μην παρεμποδίζουν ιδιαίτερα τη ροή. Οι μικροστήλες που διατίθενται στο εμπόριο κυκλοφορούν σε διάφορα μεγέθη, με όγκους από 0,5 ως 10 mL και με ποσότητα υλικού πλήρωσης από 35 mg ως 2 g.

Ο εξοπλισμός που απαιτείται στην SPE είναι απλός. Ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων, χρησιμοποιείται μια από τις διατάξεις του Σχήματος 2.2. Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε κενό, σε διάταξη πολλών μικροστηλών (Σχήμα 2.2γ).



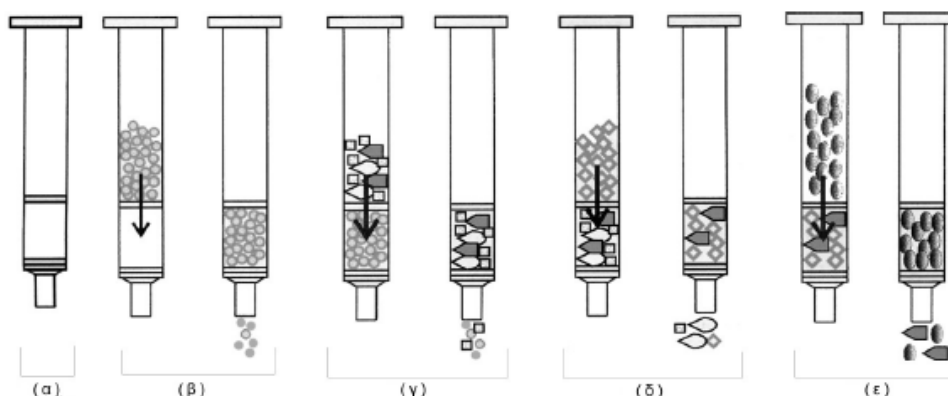
Σχήμα 2.2 : Διατάξεις που χρησιμοποιούνται στην SPE. α) Εφαρμογή πίεσης με σύριγγα, β) εφαρμογή κενού και γ) εφαρμογή κενού, σε διάταξη πολλών μικροστηλών.

Ανεξάρτητα από τη μέθοδο και τη διάταξη που χρησιμοποιείται στην SPE, οι ταχύτητες ροής δεν πρέπει να είναι μεγάλες, αλλιώς ο χρόνος επαφής του δείγματος με τη στατική φάση της μικροστήλης είναι ανεπαρκής. Στην εκχύλιση στερεάς φάσης διακρίνονται δύο τύποι: 1) η κανονικής και 2) η αντίστροφης φάσης SPE, που είναι και η πλέον συνηθισμένη.

Συνήθως, τα στάδια που ακολουθούνται στην SPE είναι τα εξής :

- α) Επιλογή κατάλληλης μικροστήλης,
- β) ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού της μικροστήλης με κατάλληλο διαλύτη,
- γ) προσθήκη του δείγματος,
- δ) έκπλυση της μικροστήλης και
- ε) έκλυση των αναλυόμενων ουσιών.

Τα στάδια αυτά απεικονίζονται στο *Σχήμα 2.3*.

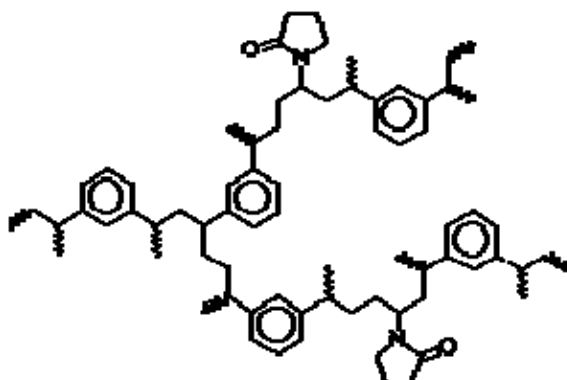


Σχήμα 2.3 : Στάδια που ακολουθούνται κατά την εκχύλιση στερεάς φάσης (Supelco, 1998)

α) Επιλογή κατάλληλης μικροστήλης : Η επιλογή της κατάλληλης μικροστήλης εξαρτάται από τη φύση και την συγκέντρωση των αναλυόμενων ενώσεων, τη φύση του διαλύτη του δείγματος, καθώς και από τον όγκο του δείγματος. Το υλικό πλήρωσης της στήλης πρέπει να αλληλεπιδρά, όσο πιο εκλεκτικά γίνεται, με τις αναλυόμενες ενώσεις. Η αλληλεπίδραση αυτή εξαρτάται τόσο από τη φύση των αναλυόμενων ενώσεων όσο και από τη φύση του διαλύτη, στον οποίο είναι διαλυμένες (οργανικά ή υδατικά διαλύματα). Ο όγκος του δείγματος και η συγκέντρωση των αναλυόμενων ενώσεων θα πρέπει να είναι τέτοια, ώστε να μην υπερβαίνουν τη χωρητικότητα της μικροστήλης (*Thurman, 1998*).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν μικροστήλες Waters Oasis HLB, οι οποίες διαθέτουν προσροφητικό υλικό που αποτελείται τόσο από λιπόφιλες όσο και από υδρόφιλες

ομάδες. Το προσροφητικό αυτό υλικό αποτελείται από το συμπολυμερές [poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone)] που παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.4.



Σχήμα 2.4 : Δομή προσροφητικού υλικού της μικροστήλης Waters Oasis HLB

Τα κύρια χαρακτηριστικά των μικροστηλών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι : α) μέγεθος πόρων : 80 Å β) μέγεθος σωματιδίων : 30 μm γ) επιφανειοδραστικό : συμπολυμερές του m-διβυνιλοβενζολίου και N-βινυλοπυρολιδίνης.

β) Ενεργοποίηση μικροστήλης : Πραγματοποιείται πριν από την προσθήκη του δείγματος. Το υλικό πλήρωσης της στήλης ενεργοποιείται με τη διέλευση από τη μικροστήλη μερικών όγκων κατάλληλου διαλύτη. Στην παρούσα εργασία για την ενεργοποίηση της μικροστήλης χρησιμοποιήθηκαν 10 mL μεθανόλης / ακετόνης με αναλογία 6/4 και στη συνέχεια 10 mL υπερκάθαρο νερό. Ο σκοπός του σταδίου αυτού είναι διπλός: 1) η απομάκρυνση τυχόν ακαθαρσιών και προσμίξεων από το υλικό πλήρωσης της μικροστήλης και 2) η ενεργοποίηση των χαρακτηριστικών ομάδων του προσροφητικού.

γ) Προσθήκη του δείγματος : Το προστιθέμενο δείγμα πρέπει να είναι διαλυμένο σε ασθενή διαλύτη, ώστε να επιτραπεί η ισχυρή συγκράτησή του από το προσροφητικό υλικό. Το δείγμα συνήθως μεταφέρεται είτε με μικροπιπέτες είτε με σύριγγες. Για την αντίστροφης φάσης - SPE οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την προσθήκη του δείγματος είναι νερό ή κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα με μικρό ποσοστό οργανικού διαλύτη. Για να αποφευχθεί η απόφραξη των μικροστηλών, καλό είναι το δείγμα πρώτα να διηθείται ή να φυγοκεντρείται. Συνήθως σ' αυτό το στάδιο, οι ταχύτητες ροής είναι της τάξης των 2 - 4 mL.min⁻¹.

δ) Έκπλυση της μικροστήλης : Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η απομάκρυνση των ενώσεων του δείγματος που παρεμποδίζουν, με πλύση της μικροστήλης με διαλύτη ενδιάμεσης εκλουστικής ισχύος, ώστε ν' αποφευχθούν οι απώλειες των ενώσεων που μας ενδιαφέρουν και ταυτόχρονα να επιτευχθεί επαρκής καθαρισμός του δείγματος. Στην RP-SPE συνήθως χρησιμοποιείται νερό ή κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα για τον καθαρισμό του δείγματος, μερικές φορές όμως, ο καθαρισμός δεν είναι επαρκής και χρησιμοποιείται και ένα μικρό ποσοστό οργανικού διαλύτη. Τέλος, απαιτείται προσοχή στο πόσες φορές θα επαναληφθεί το στάδιο της έκπλυσης της μικροστήλης, ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητικός καθαρισμός του δείγματος χωρίς απώλειες. Η έκπλυση της μικροστήλης στην παρούσα διατριβή γίνεται με 500μL υπερκάθαρο νερό.

ε) Έκλουση των αναλυόμενων ουσιών : Στο στάδιο αυτό γίνεται η έκλουση από τη μικροστήλη των ενώσεων του δείγματος, που μας ενδιαφέρουν, με τη χρήση κατάλληλου διαλύτη, με ισχυρότερη εκλουστική ισχύ από το διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε κατά την έκπλυση της μικροστήλης. Ο όγκος του χρησιμοποιούμενου διαλύτη πρέπει να είναι όσο το δυνατό μικρότερος, ώστε ν' αποφευχθεί αραίωση του δείγματος, αν και συνήθως μετά το στάδιο αυτό ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη και επαναδιάλυση του δείγματος σε κατάλληλο διαλύτη, για την έγχυσή του στην αναλυτική στήλη.

Στο στάδιο της έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν 5mL μεθανόλης – ακετόνης (6/4). Τα εκλούσματα εξατμίζονται σχεδόν μέχρι ξηρού με διαβίβαση ρεύματος αερίου N₂ και στη συνέχεια προστέθηκαν 2ml μεθανόλης με υπερκάθαρο νερό σε αναλογία ένα προς ένα.

Προκειμένου να εξασφαλιστεί η απουσία σωματιδίων τα οποία θα μπορούσαν να προκαλέσουν μπλοκάρισμα στην βελόνα του αυτόματου δειγματολήπτη ή και στην ίδια την στήλη κατά το διαχωρισμό, μετά το τέλος της εκχύλισης στερεάς φάσης το δείγμα φιλτράρεται με φίλτρο 0.45μm της Gelman (PALL GHP ACRODISC 13). Το φιλτράρισμα αυτό πραγματοποιείται με εισαγωγή του δείγματος σε σύριγγα και εξαγωγή αυτού μέσω του φίλτρου το οποίο έχει εφαρμοστεί στην έξοδο της σύριγγας.

2.5 Συνεχής Εκχύλιση (Soxhlet)

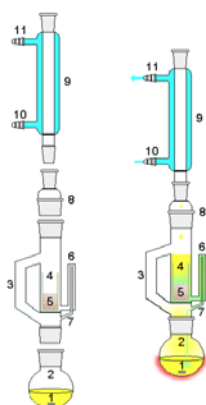
Το στερεό δείγμα τοποθετείται σε ένα πορώδης φυσίγγιο (κυτταρίνη). Στη σφαιρική φιάλη εισάγουμε το διαλύτη. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν περίπου 200 mL μεθανόλης. Ο διαλύτης θερμαίνεται μέσω θερμαντικής πλάκας με σκοπό το σύστημα

να γίνει κορεσμένο στους ατμούς του διαλύτη. Οι ατμοί αυτοί οδηγούνται μέσω του εξωτερικού σωλήνα προς το υπόλοιπο σύστημα. Ο ψυκτήρας υγροποιεί τους ατμούς με αποτέλεσμα αυτοί να καταλήγουν στο φυσίγγιο εκχύλισης όπου περιέχονται τα φίλτρα με τη σωματιδιακή φάση (Σχήμα 2.5).

Με το πέρασμα του χρόνου ο όγκος του διαλύτη αυξάνει στον χώρο όπου βρίσκονται τα φίλτρα. Λόγω της ανόδου της στάθμης του διαλύτη με τον χρόνο μετά από ένα συγκεκριμένο όγκο το διάλυμα που έχει προκύψει, και περιέχει και τις 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.

Για όσο χρόνο παρέχουμε θερμότητα στην σφαιρική φιάλη ακολουθείται η παραπάνω διαδικασία. Στη σωματιδιακή φάση των δειγμάτων του βιολογικού καθαρισμού η συνεχής εκχύλιση διέρκεισε 24 ώρες, με 2 κύκλους στη μια ώρα. 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.

Η συνεχής εκχύλιση θεωρείται ολοκληρωμένη όταν ο διαλύτης έχει το ίδιο χρώμα τόσο στη σφαιρική φιάλη όσο και εκεί που περιέχονται τα φίλτρα με τη σωματιδιακή φάση (Dean, 1998).



Σχήμα 2.5 : 1. Μαγνητικός αναδευτήρας 2. Σκεύος απόσταξης (σφαιρική φιάλη) 3. Η διαδρομή της απόσταξης 4. Φυσίγγιο εκχύλισης 5. Σωματιδιακή φάση 6. Εσωτερικός σωλήνας 7. Εξωτερικός σωλήνας 8. Εξάρτημα προσαρμογής 9. Ψυκτήρας 10. Είσοδος νερού ψυκτήρα 11. Έξοδος νερού ψυκτήρα.

Μετά το τέλος της παραπάνω διαδικασίας, ο διαλύτης που περιέχεται στη σφαιρική φιάλη απομακρύνεται με περιστροφικό εξατμιστήρα σχεδόν μέχρι ξηρού και προστίθεται στο δείγμα υπερκάθαρο νερό και γλουταθειόνη. Στη συνέχεια, ακολουθείται η εκχύλιση στερεάς φάσης που περιγράφηκε στην Παράγραφο 2.3.

2.6 Υγρή Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης

Στη Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (Reversed Phase Chromatography, RPC), η στατική φάση είναι μη πολική (υδρόφοβη). Συνήθως χρησιμοποιείται διοξείδιο του πυριτίου συζευγμένο με αλυσίδες άνθρακα (C_4 , C_8 και C_{18}), φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες, κ.ά., ενώ η κινητή φάση είναι πολική π.χ. μίγματα νερού και μεθανόλης ή ακετονιτριλίου. Έτσι, οι λιγότερο πολικές ενώσεις προσροφούνται έντονα από τη στατική φάση και εκκλύονται τελευταίες (Skoog, Holler 2002).

Η RPC αποτελεί την πρώτη επιλογή για τα περισσότερα δείγματα, είναι πιο διαδεδομένη από τα υπόλοιπα είδη της Υγρής Χρωματογραφίας (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) και είναι πιο πιθανό να μας δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα διαχωρισμού. Οι στήλες που χρησιμοποιούνται στην RPC είναι σταθερές και δίνουν επαναλήψιμα αποτελέσματα (Snyder, 1997). Συνήθως, η ανίχνευση είναι πιο εύκολη στην RPC (ιδίως για τους ανιχνευτές Υπεριώδους-Ορατού), εξαιτίας των διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην κινητή φάση. Αν και οι περισσότερες οργανικές ενώσεις έχουν περιορισμένη διαλυτότητα στις υδατικές κινητές φάσεις, αυτό δεν αποτελεί σημαντικό περιορισμό, επειδή χρησιμοποιούνται συνήθως μικρές ποσότητες (μικρογραμμάρια ή νανογραμμάρια). Στις περιπτώσεις όπου η διαλυτότητα των δειγμάτων στις κινητές φάσεις της RPC είναι πολύ μικρή, προτιμάται η χρωματογραφία κανονικής φάσης. Τα πολύ υδρόφοβα μόρια συγκρατούνται πολύ ισχυρά στη στήλη και μπορεί να χρειαστεί να χρησιμοποιηθούν μη υδατικές συνθήκες. Μερικά πολύ υδρόφιλα δείγματα μπορεί να μη συγκρατούνται επαρκώς με την RPC, ακόμη και όταν χρησιμοποιούνται κινητές φάσεις με πολύ μικρά ποσοστά οργανικού διαλύτη, οπότε εφαρμόζεται η μέθοδος της Χρωματογραφίας Σχηματισμού Ζεύγους Ιόντων (Ion-pair Chromatography).

Η συγκράτηση μιας ένωσης στην RPC εξαρτάται από την πολικότητά της και τις πειραματικές συνθήκες, δηλαδή την κινητή, τη στατική φάση και τη θερμοκρασία. Στον Πίνακα 2.3 δίνονται οι προτεινόμενες συνθήκες για την ελάττωση ή αύξηση των χρόνων συγκράτησης (t_R) των περισσοτέρων ενώσεων.

Η κινητή φάση είναι μια πολύ σημαντική παράμετρος στην RPC. Ο τύπος της κινητής φάσης, που θα χρησιμοποιηθεί, παίζει σημαντικό ρόλο στη συγκράτηση. Μπορεί να καταλάβει ενεργές θέσεις του διοξειδίου του πυριτίου ή οποιουδήποτε άλλου προσροφητικού, εμποδίζοντας έτσι τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυόμενων ενώσεων και της στατικής φάσης.

Πίνακας 2.3 : Τρόποι μεταβολής του χρόνου συγκράτησης στην RPC

<i>Ελάττωση t_R</i>	<i>Αύξηση t_R</i>
Πιο πολική στήλη (C_4 , CN)	Λιγότερο πολική στήλη (C_8 , C_{18})
Λιγότερο πολική κινητή φάση (μεγαλύτερο ποσοστό οργανικού διαλύτη)	Περισσότερο πολική κινητή φάση (μικρότερο ποσοστό οργανικού διαλύτη ή πιο πολικοί οργανικοί διαλύτες)
Υψηλότερη θερμοκρασία	Χαμηλότερη θερμοκρασία

Το πρώτο βήμα στην ανάπτυξη μιας μεθόδου διαχωρισμού είναι η επιλογή του υλικού πλήρωσης της στήλης, ενώ το δεύτερο πιο σημαντικό βήμα είναι η επιλογή της κατάλληλης κινητής φάσης. Οι αναλυόμενες ενώσεις πρέπει να είναι διαλυτές στην κινητή φάση, ώστε ν' αποφεύγονται καταβυθίσεις στη στήλη. Στον Πίνακα 2.4 δίνονται ορισμένα χαρακτηριστικά των συνηθέστερων διαλυτών στην RPC (hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book)

Πίνακας 2.4 : Χαρακτηριστικά συνηθέστερων διαλυτών στην RPC

Διαλύτης	M_r ¹	Σ.Ζ. ² °C	Δείκτης διάθλασης	UV ³ Cutoff (nm)	Ιξώδες (cP)	μ^4 (Debye)
ακετονιτρίλιο	41	82	1,341	195	0,358	3,37
αιθανόλη	46	78	1,359	205	1,19	1,68
μεθανόλη	32	65	1,326	205	0,584	1,66
ισοπροπανόλη	60	82	1,375	205	2,39	1,68
νερό	18	100	1,333	185	1	1,84

¹ M_r : Σχετική μοριακή μάζα, ²Σ.Ζ. : Σημείο ζέσης, ³Μήκος κύματος στο UV, όπου απορροφούν, ⁴ μ : διηλεκτρική σταθερά

2.7 Οργανολογία συστήματος HPLC

Στην κλασική χρωματογραφία στήλης μια απλή διάταξη αποτελούνταν από τα εξής μέρη :

- ◆ Δοχεία τα οποία περιέχουν τους διαλύτες της κινητής φάσης.
- ◆ Μια γυάλινη διαχωριστική – αναλυτική στήλη με τυπική εσωτερική διάμετρο 1 cm και μήκος 30 cm. Το υλικό πλήρωσης συγκρατείται στη στήλη είτε από μια γυάλινη φρίτα είτε από στρώμα υαλοβάμβακα.
- ◆ Μια σύριγγα ή μια βαλβίδα για την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη.
- ◆ Ένα συλλέκτη κλασμάτων, με τον οποίο μερικά μικρόλιτρα του εκλουστικού συγκεντρώνονται είτε χειρονακτικά είτε αυτόματα.
- ◆ Ένα φωτόμετρο, με κυψελίδα συνεχούς ροής, για συνεχή ανίχνευση του εκλουστικού.

Η τεχνική της HPLC αποτελεί εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας στήλης και οφείλει την ανάπτυξή της στην πρόοδο της τεχνολογίας, καθώς άρχισαν να κατασκευάζονται χαλύβδινες στήλες ανθεκτικές στις μεγάλες πιέσεις και αντλίες υψηλής πίεσης, σταθερής παροχής. Επίσης, αναπτύχθηκαν διάφοροι τύποι ανιχνευτών, όπως ανιχνευτές υπεριώδους – ορατού, αγωγιμομετρικοί και φθορισμομετρικοί, ανιχνευτές δείκτου διάθλασης κ.λ.π.

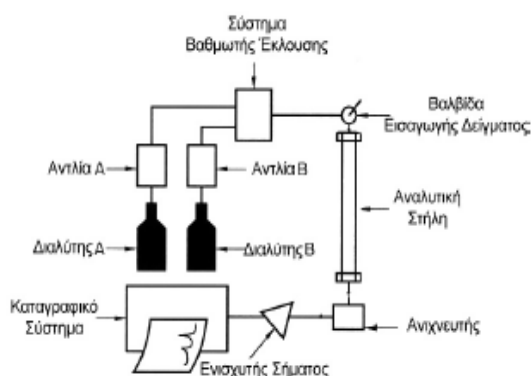
Με την αύξηση των εφαρμογών της χρωματογραφίας, άρχισαν να αυξάνονται και οι απαιτήσεις για βελτιώσεις στην οργανολογία. Έτσι, οι αντλίες υψηλής πίεσης έγιναν περισσότερο ακριβείς και τα υλικά πλήρωσης περισσότερο αποτελεσματικά για τους διάφορους διαχωρισμούς. Σήμερα, υπάρχουν αντλίες οι οποίες δίνουν με ρύθμιση μέσα από μικροϋπολογιστή, βαθμιαία μεταβαλλόμενη με τον χρόνο παροχή εκλουστικού (Gradient Elution).

Σε σχέση με την κλασική χρωματογραφία, η HPLC διαφέρει ως προς το ότι χρησιμοποιεί μικρόκκοκα υλικά πλήρωσης και εφαρμόζονται μεγάλες πιέσεις. Υπερτερεί δε της χρωματογραφίας στήλης, επιτυγχάνοντας ταχύτερους και μεγαλύτερης απόδοσης διαχωρισμούς μιγμάτων (Snyder 1997).

Μια διάταξη ενός συστήματος HPLC, όπως δίνεται στο *Σχήμα 2.6*, αποτελείται από :

- Το δοχείο ή τα δοχεία των διαλυτών της κινητής φάσης (ανάλογα με το αν η έκλυση είναι ισοκρατική ή βαθμιδωτή).
- Την αντλία ή τις αντλίες (ανάλογα με το αν η μίξη είναι χαμηλής ή υψηλής πίεσης).

- Το σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης (περιλαμβάνει τον ρυθμιστή διαλυτών και τον μίκτη).
- Τη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος.
- Την αναλυτική στήλη και πιθανώς πριν από αυτή μια προσθήλη.
- Τον ανιχνευτή.
- Το καταγραφικό σύστημα.



Σχήμα 2.6 : Σχηματική διάταξη συστήματος HPLC

Η στήλη είναι το σημαντικότερο τμήμα ενός συστήματος HPLC, επειδή εκεί πραγματοποιείται ο διαχωρισμός. Η απόδοση όμως του συστήματος εξαρτάται όχι μόνο από τη βελτιστοποίηση του αριθμού των θεωρητικών πλακών της στήλης, αλλά επίσης και από την ελαχιστοποίηση των παραγόντων, που προκαλούν διεύρυνση της κορυφής και οι οποίοι οφείλονται στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος ή στον ανιχνευτή ή τέλος στη διέλευση του δείγματος διαμέσου μεγάλου μήκους συνδετικών σωληνώσεων. Η σχέση που αποδίδει τα ανωτέρω είναι :

$$W_{total} = W_v^2 + W_{ing} + W_{con} + W_{det} = W_v^2 + W_{app}^2$$

όπου W_{total} = το συνολικό εύρος κορυφής (που μετράται στον ανιχνευτή),

W_v = το εύρος της κορυφής που εξαρτάται μόνο από τη στήλη,

W_{ing} = το εύρος που εξαρτάται από το σύστημα έγχυσης του δείγματος,

W_{con} = το εύρος που εξαρτάται από τις σωληνώσεις και τα τμήματα σύνδεσης και

W_{det} = το εύρος της κορυφής που εξαρτάται από τον ανιχνευτή.

Το εύρος της κορυφής που οφείλεται στους τρεις τελευταίους παράγοντες, *Wapp*, αποτελεί την εκτός στήλης διεύρυνση της κορυφής. Το μέγεθος αυτό μπορεί να μετρηθεί, εάν παραλείποντας τη στήλη και συνδέοντας το σύστημα εισαγωγής του δείγματος απευθείας με τον ανιχνευτή μετρηθεί το εύρος της κορυφής του διαλύτη.

Στη συνέχεια περιγράφονται τα επιμέρους τμήματα ενός συστήματος HPLC.

2.7.1 Δοχεία διαλυτών

Οι διαλύτες, που χρησιμοποιούνται στην κινητή φάση, αποθηκεύονται σε γυάλινα δοχεία ή δοχεία από ανοξειδωτο χάλυβα. Τα διαλυμένα αέρια, όπως το άζωτο και το οξυγόνο καθώς επίσης και τα αιωρούμενα σωματίδια, πρέπει να απομακρύνονται, γιατί δημιουργούν σοβαρά προβλήματα στις αντλίες και τον ανιχνευτή. Ο πιο απλός τρόπος για την απομάκρυνση των στερεών σωματιδίων είναι η διήθηση με φίλτρα πολύ μικρής διαμέτρου πόρων (0,2 μm) και χρήση κενού. Η απομάκρυνση των διαλυμένων αερίων γίνεται με απαέρωση των διαλυτών (Kellner, 1998).

Απαέρωση διαλυτών

Οι φυσαλίδες αέρα, στην κινητή φάση ενός συστήματος υγρής χρωματογραφίας, μπορεί να προκαλέσουν διάφορα προβλήματα. Η αξιοπιστία του συστήματος άντλησης μειώνεται, όταν οι φυσαλίδες παρεμποδίζουν τη σωστή λειτουργία των βαλβίδων της αντλίας ή γεμίζουν τους θαλάμους των πιστονιών με αέρα. Ψευδο-κορυφές (ghost peaks) δημιουργούνται, όταν φυσαλίδες αερίων περάσουν στις κυψελίδες των ανιχνευτών. Για τους λόγους αυτούς είναι απαραίτητη η απαέρωση της κινητής φάσης πριν από τη χρήση της.

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι απαέρωσης της κινητής φάσης, όπως η απαέρωση με διέλευση για κάποιο χρονικό διάστημα (συνήθως 20 min) κάποιου ευγενούς αερίου π.χ. He, από τα δοχεία των διαλυτών με χρήση λουτρού υπερήχων ή με εφαρμογή κενού και τέλος με επαναροή των διαλυτών. Η πιο αποτελεσματική μέθοδος απαέρωσης – παρ' ότι δεν είναι ιδιαίτερα πρακτική – είναι η μέθοδος της επαναροής, όπου οι διαλύτες βράζουν και απομακρύνονται τα αέρια από το διάλυμα. Η απαέρωση με διέλευση ρεύματος ευγενούς αερίου απομακρύνει περίπου το 80% των αερίων από το διάλυμα και η απαέρωση με εφαρμογή κενού απομακρύνει περισσότερο από το 60% των αερίων, οπότε και οι δύο αυτές μέθοδοι ελαττώνουν ικανοποιητικά το επίπεδο των διαλυμένων αερίων.

2.7.2 Είδη έκλουσης

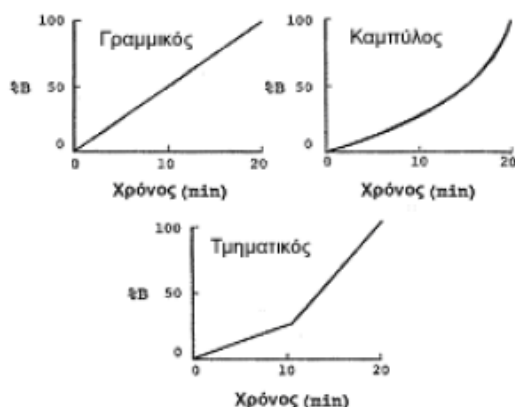
Ως κινητή φάση στην HPLC αναφέρεται ο διαλύτης, ο οποίος διέρχεται συνεχώς μέσα από τη στήλη. Η κινητή φάση λειτουργεί ως μεταφορέας του δείγματος. Καθώς το διάλυμα του δείγματος περνάει μέσα από τη στήλη με την κινητή φάση, ο χρόνος συγκράτησης των συστατικών του εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις τους με τη στατική και την κινητή φάση. Οι χημικές αλληλεπιδράσεις της κινητής φάσης και του δείγματος με τη στατική φάση καθορίζουν τον βαθμό της μετακίνησης και του διαχωρισμού των συστατικών του δείγματος. Για παράδειγμα, τα συστατικά του δείγματος που αλληλεπιδρούν πιο έντονα με την κινητή φάση εκλούνται από τη στήλη γρήγορα και έχουν μικρούς χρόνους συγκράτησης και το αντίστροφο. Η κινητή φάση μπορεί να μεταβάλλεται ή όχι με το χρόνο, για να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις του δείγματος με τη στατική φάση. Έτσι, προκύπτουν δύο είδη έκλουσης, η ισοκρατική και η βαθμιδωτή έκλουση.

Ισοκρατική έκλουση

Στην ισοκρατική έκλουση οι ενώσεις εκλούνται χρησιμοποιώντας κινητή φάση σταθερής σύστασης. Όλες οι ενώσεις ξεκινούν τη μετακίνησή τους μέσα στη στήλη από την αρχή, όμως η κάθε ένωση μετακινείται με διαφορετική ταχύτητα λόγω των αλληλεπιδράσεών της με τη στατική φάση, έχοντας ως αποτέλεσμα τη γρήγορη ή αργή έκλουσή της. Αυτός ο τύπος έκλουσης είναι απλός και φθηνός, αλλά σε μερικές περιπτώσεις ο διαχωρισμός δεν είναι ικανοποιητικός και οι χρόνοι ανάλυσης είναι μεγάλοι (<http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/>).

Βαθμιδωτή έκλουση

Στη βαθμιδωτή έκλουση η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του χρωματογραφικού διαχωρισμού και στα σύγχρονα όργανα υπάρχει η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν εκλουστικά συστήματα μέχρι και τεσσάρων διαλυτών. Συνήθως, χρησιμοποιούνται εκλουστικά συστήματα δύο διαλυτών, Α και Β, και αυξάνεται το ποσοστό του πιο ισχυρού διαλύτη κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού. Διάφοροι τύποι βαθμιδωτής έκλουσης δίνονται στο *Σχήμα 2.7*. Στα παραδείγματα που δίνονται στο σχήμα παρατηρείται αύξηση της περιεκτικότητας του Β, από 0% σε 100% μέσα σε 20 min. Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος τύπος βαθμιδωτής έκλουσης είναι ο γραμμικός.



Σχήμα 2.7 : Τύποι βαθμιδωτής έκλουσης

Η βαθμιδωτή έκλουση είναι απαραίτητη για τον διαχωρισμό μεγάλου αριθμού ενώσεων σε πολλές κατηγορίες δειγμάτων. Υπάρχουν όμως και κάποια μειονεκτήματα σε ότι αφορά τη χρήση της, όπως :

- Η πολυπλοκότητά της, η οποία καθιστά δυσκολότερη την ανάπτυξη μιας μεθόδου.
- Η ασυμβατότητά της με ορισμένους τύπους ανιχνευτών, όπως οι ανιχνευτές δείκτου διάθλασης.
- Οι μεγάλοι χρόνοι ανάλυσης, οι οποίοι απαιτούνται και που μερικώς οφείλονται στη διαδικασία εξισορρόπησης της αναλυτικής στήλης στην αρχική σύσταση.
- Η δυσκολία εφαρμογής της, ορισμένες φορές, από άλλους ερευνητές, εξαιτίας διαφορών στον εξοπλισμό.
- Τα προβλήματα σταθερότητας στη βασική γραμμή, τα οποία εμφανίζονται πιο συχνά απ' ότι κατά την ισοκρατική έκλουση, και η απαίτηση για χρήση διαλυτών υψηλής καθαρότητας.
- Η έλλειψη του απαραίτητου εξοπλισμού σε ορισμένα εργαστήρια.

Παρά τα μειονεκτήματά της η βαθμιδωτή έκλουση ορισμένες φορές είναι η μόνη επιλογή. Προτιμάται, όταν συντρέχει μια από τις παρακάτω περιπτώσεις :

- Όταν πρέπει να διαχωριστούν ενώσεις με πολύ διαφορετικές τιμές του συντελεστή κατακράτησης k' .
- Όταν οι ενώσεις που περιέχονται στο δείγμα έχουν υψηλή σχετική μοριακή μάζα, μεγαλύτερη από 1000, και ιδιαίτερα στην περίπτωση βιολογικών δειγμάτων.

- Όταν τα δείγματα περιέχουν παρεμποδίζουσες ενώσεις, οι οποίες εκκλούνται αργά και μπορεί είτε να «μπλοκάρουν» τη στήλη είτε να εκλουστούν κατά τη διάρκεια ενός από τους επόμενους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς.
- Όταν τα δείγματα είναι διαλυμένα σ' ένα ασθενή διαλύτη, π.χ. έγχυση υδατικών διαλυμάτων σε στήλη αντίστροφης φάσης.

Σε κάθε σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης οι πιο σημαντικοί παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη, είναι η επαναληψιμότητα του συστήματος και η ευκολία με την οποία η στήλη μπορεί να εξισορροπήσει με την αρχική σύσταση του διαλύτη στο τέλος της ανάλυσης.

2.7.3 Αντλίες HPLC

Οι αντλίες που χρησιμοποιούνται στην HPLC πρέπει να είναι ικανές να παρέχουν συνεχή και επαναλήψιμη ροή εκλουστικού στη στήλη υπό υψηλή πίεση. Οι απαιτήσεις μιας καλής αντλίας περιλαμβάνουν :

1. Παροχή σταθερής ροής, χωρίς παλμούς, ώστε να ελαχιστοποιείται ο θόρυβος του ανιχνευτή.
2. Ικανότητα να παρέχει ένα εύρος ταχυτήτων ροής, κατάλληλων για τους διάφορους τύπους της HPLC (για συνήθη χρήση, έχουμε ροές από 0,5 έως 10,0 mL.min⁻¹ και για χρήση μικροστηλών 1 μL.min⁻¹ έως 1 mL.min⁻¹).
3. Επαναληψιμότητα ροής, ώστε να διασφαλίζεται επαρκής αναλυτική ακρίβεια.
4. Ικανότητα λειτουργίας υπό υψηλές πιέσεις (συνήθως έως τα 6000 psi).
5. Αντοχή των διαφόρων τμημάτων της αντλίας, που έρχονται σε επαφή με τους διαλύτες. Τα μέρη της αντλίας που έρχονται σε επαφή με το εκλουστικό είναι συνήθως από κεραμικό, ανοξείδωτο χάλυβα ή PTFE. Σε ορισμένες παλινδρομικές αντλίες τα πιστόνια και τα σφαιρίδια των βαλβίδων είναι από ζαφείρι.
6. Μικρούς όγκους συγκράτησης στους θαλάμους της αντλίας, ώστε να είναι επιτρεπτές οι απότομες αλλαγές διαλύτη καθώς και η βαθμιδωτή έκλουση. Η ροή f_V , που παράγεται από μια αντλία, σχετίζεται με την πίεση λειτουργίας ως εξής :

$$\Delta P = f_V R$$

όπου R = η αντίσταση στη ροή, που δημιουργείται από τη στήλη, στις συνδετικές σωληνώσεις κ.ά.

Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες αντλιών, που βασίζονται στην παραπάνω σχέση :

- 1) Οι αντλίες σταθερής πίεσης, όπου η ταχύτητα ροής εξαρτάται από την αντίσταση του συστήματος. Χρησιμοποιούνται κυρίως για την πλήρωση των στηλών με τη στατική φάση.
- 2) Οι αντλίες σταθερής ροής, στις οποίες η πίεση αλλάζει ανάλογα με την αντίσταση του συστήματος. Χρησιμοποιούνται σε όλες τις εφαρμογές της HPLC. Το βασικό πλεονέκτημά τους είναι ότι εξασφαλίζουν επαναλήψιμο όγκο έκλουσης και επαναλήψιμα εμβαδά κορυφών, ανεξάρτητα από τις αλλαγές στο ιξώδες της κινητής φάσης ή από τυχόν μπλοκάρισμα της στήλης (Snyder, 1997).

2.7.4 Συστήματα εισαγωγής δείγματος

Το σύστημα εισαγωγής δείγματος στην HPLC πρέπει :

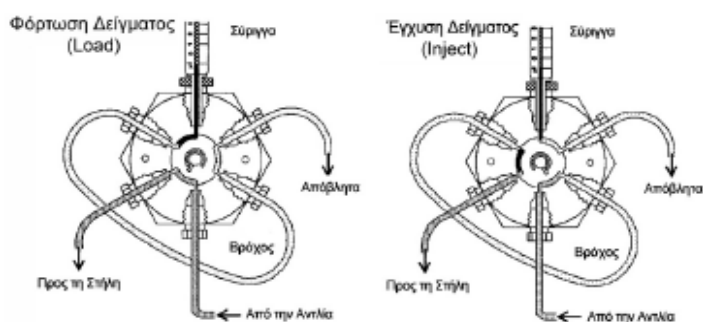
- 1) Να μπορεί να εισάγει το δείγμα στην κορυφή της στήλης σε μια στενή ζώνη, για να αποφευχθεί η διεύρυνση της κορυφής.
- 2) Να μπορεί να λειτουργεί υπό υψηλές πιέσεις.
- 3) Να είναι επαναλήψιμο.

Επίσης, το σύστημα εισαγωγής δείγματος πρέπει να είναι κατασκευασμένο από υλικά, τα οποία να είναι συμβατά με τους διάφορους διαλύτες. Συνήθως, χρησιμοποιείται ανοξειδωτος χάλυβας. Η εισαγωγή του δείγματος μπορεί να γίνει με τρία διαφορετικά συστήματα: α) με **μικροσύριγγα**, β) με **ειδική βαλβίδα εισαγωγής** και γ) με **αυτόματο δειγματολήπτη**.

Η απευθείας εισαγωγή του δείγματος στη στήλη μπορεί να επιτευχθεί με μια **μικροσύριγγα** (1-10 μL), διαμέσου ενός εισαγωγέα δείγματος διαφράγματος (septum). Η βελόνα πρέπει να οδηγείται προσεκτικά πριν και μετά το διάφραγμα, ώστε να αποφευχθεί το λύγισμά της και να επιτραπεί κεντρική έγχυση του δείγματος στη στήλη. Μ' αυτό το σύστημα, το δείγμα εισάγεται κεντρικά στο ρεύμα του εκλουστικού. Τα κύρια μειονεκτήματα της εισαγωγής δείγματος με σύριγγα προκύπτουν από τη φθορά του διαφράγματος και την πιθανή συχνή αντικατάσταση της σύριγγας. Αυτός ο τύπος εισαγωγής δείγματος περιορίζεται σε χαμηλές πιέσεις μέχρι 1500 psi, εκτός και αν χρησιμοποιηθούν ειδικές σύριγγες υψηλής πίεσης ή αν διακόψουμε τη ροή του εκλουστικού, ώστε να ελαττωθεί η πίεση πριν γίνει η έγχυση. Στην τελευταία περίπτωση, όταν οι ανιχνευτές είναι ευαίσθητοι στις αλλαγές της ροής του εκλουστικού, τότε διαταράσσεται η βασική τους γραμμή. Τέλος, η επαναληψιμότητα αυτού του συστήματος δεν είναι τόσο καλή, ώστε να χρησιμοποιείται για ποσοτικούς προσδιορισμούς.

Η **βαλβίδα εισαγωγής δείγματος** είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος τύπος συστήματος εισαγωγής του δείγματος στην HPLC, ιδιαίτερα για αναλύσεις ρουτίνας και ποσοτικούς προσδιορισμούς. Σ' αυτό το σύστημα, ένας βρόχος συγκεκριμένου όγκου γεμίζει με το δείγμα, χρησιμοποιώντας μια σύριγγα, όταν η βαλβίδα είναι στη θέση «φόρτωσης» (Load). Στη συνέχεια, με περιστροφή της βαλβίδας στη θέση «έγχυση» (Inject), το εκλουστικό περνάει μέσα από τον βρόχο και παρασύρει το δείγμα μέσα στη στήλη. Στους περισσότερους αναλυτικούς προσδιορισμούς χρησιμοποιείται βαλβίδα έξι θέσεων με εξωτερικό βρόχο όγκου 10 - 20 μL . Μια τέτοια βαλβίδα παρουσιάζεται στο *Σχήμα 2.8*.

Για μεγαλύτερη ακρίβεια εισαγωγής του δείγματος πρέπει να γεμίζει ολόκληρος ο βρόχος και ο όγκος του δείγματος που εγχύεται να αλλάζει με αλλαγή του βρόχου. Υπάρχει η δυνατότητα εισαγωγής μικρότερου όγκου δείγματος, γεμίζοντας μερικώς τον βρόχο, αλλά η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα είναι κατά πολύ μικρότερες. Για εισαγωγή πολύ μικρών όγκων, και κυρίως όταν χρησιμοποιούνται μικροστήλες, προτιμούνται εσωτερικοί βρόχοι. Σ' αυτή την περίπτωση, ο βρόχος είναι ένα αυλάκι στο εσωτερικό της βαλβίδας. Υπάρχουν βαλβίδες με εσωτερικό βρόχο όγκου μέχρι 0,06 μL .



Σχήμα 2.8 : Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος

Για αναλύσεις ρουτίνας προτιμούνται οι **αυτόματοι δειγματολήπτες**. Αυτοί αποτελούνται από τη βαλβίδα εισαγωγής, τον βρόχο δείγματος, τη σύριγγα, τα φιαλίδια, που περιέχουν τα δείγματα, και τον περιστρεφόμενο δίσκο, στον οποίο τοποθετούνται τα φιαλίδια. Τα φιαλίδια των δειγμάτων μετακινούνται προγραμματισμένα στην κατάλληλη θέση και το δείγμα είτε αντλείται είτε αναρροφάται στον βρόχο. Η βαλβίδα λειτουργεί αυτόματα και μετά από κάθε εισαγωγή επανέρχεται στη θέση έγχυσης του δείγματος (load position) και είναι έτοιμη για την επόμενη έγχυση. Για την αποφυγή επιμόλυνσης του δείγματος παρεμβάλλονται φυσαλίδες αέρα, ενώ η σύριγγα πλένεται πριν και μετά την εισαγωγή του.

2.7.5 Αναλυτικές στήλες

Οι στήλες της υγρής χρωματογραφίας συνήθως κατασκευάζονται από σωλήνες ανοξειδωτού χάλυβα, αν και μερικές φορές, όταν εφαρμόζονται χαμηλές πιέσεις (<600 psi), χρησιμοποιούνται χοντροί γυάλινοι σωλήνες. Το μήκος των περισσοτέρων αναλυτικών στηλών κυμαίνεται από 10 έως 30 cm, με εσωτερική διάμετρο από 4 έως 10 mm. Τα υλικά πλήρωσης έχουν συνήθως μέγεθος σωματιδίων από 5 έως 10 μm. Οι στήλες αυτές έχουν συνήθως 40.000 με 60.000 θεωρητικές πλάκες ανά μέτρο. Τα τελευταία χρόνια κατασκευάζονται στήλες με εσωτερική διάμετρο από 1 έως 4,6 mm και μήκη από 3 έως 7,5 cm. Αυτές οι στήλες, που περιέχουν σωματίδια διαμέτρου 3 ή 5 μm, έχουν μέχρι και 100.000 θεωρητικές πλάκες ανά μέτρο και πλεονεκτούν έναντι των προηγούμενων ως προς την ταχύτητα έκλουσης και την οικονομία στην κατανάλωση διαλυτών.

Υλικά πλήρωσης HPLC

Η πηκτική διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) είναι το πιο διαδεδομένο υλικό πλήρωσης στην HPLC. Η χημική του σύσταση μπορεί να εκφραστεί ως $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, που σημαίνει ότι το νερό είναι χημικά δεσμευμένο σε μη στοιχειομετρική ποσότητα. Η επιφάνειά του αποτελείται από σιλανολικές (-SiOH) και σιλοξανικές (-Si-O-Si-) ομάδες. Μερικές σιλανολικές ομάδες είναι ελεύθερες, ενώ άλλες είναι ενωμένες ανά δύο με δεσμούς υδρογόνου. Το υλικό πλήρωσης μπορεί να είναι πορώδες ή μη πορώδες. Το μη πορώδες αποτελείται από ένα εσωτερικό συμπαγή πυρήνα και μια πορώδη εξωτερική στιβάδα, ενώ η μέση διάμετρος των πόρων είναι 80 - 120 Å. Υπάρχει επίσης και ένα τρίτο είδος υλικού πλήρωσης, το υλικό διάχυσης, που έχει δύο ειδών πόρους: πόρους μεγάλης διαμέτρου διείσδυσης και μικρούς πόρους διάχυσης, οι οποίοι δημιουργούν μεγάλη ειδική επιφάνεια και μικρές διαδρομές διάχυσης.

Οι στήλες HPLC συνήθως γεμίζονται με πολύ μικρά σωματίδια προσροφητικού υλικού, κατά προτίμηση σφαιρικά. Άμορφα σωματίδια παράγονται συνήθως με άλεσμα του άκαμπτου πορώδους διοξειδίου του πυριτίου (xerogels). Το κοσκίνισμα, που ακολουθεί, επιτρέπει τον διαχωρισμό των σωματιδίων κατά μέγεθος. Συνήθως, οι στήλες στις οποίες χρησιμοποιούνται άμορφα σωματίδια έχουν μικρότερη ικανότητα διαχωρισμού σε σύγκριση με τις στήλες που περιέχουν σφαιρικά σωματίδια. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την κατασκευή των σφαιρικών σωματιδίων silica.

Το μέγεθος των σωματιδίων είναι μια παράμετρος, η οποία εξαρτάται από τη γεωμετρία τους. Για σφαιρικά σωματίδια το μέγεθος αναφέρεται στη διάμετρό τους. Για τα άμορφα σωματίδια

το μέγεθος αναφέρεται στη διάμετρο σφαίρας, η οποία έχει τον ίδιο όγκο με το σωματίδιο. Τα σωματίδια του διοξειδίου του πυριτίου έχουν πάντα μια διασπορά στο μέγεθός τους, γι' αυτό ως διάμετρο στα υλικά πλήρωσης στην HPLC εννοούμε τον μέσο όρο των διαμέτρων όλων των σωματιδίων. Όσο μικρότερη είναι η διασπορά στο μέγεθος των σωματιδίων, τόσο πιο ομοιόμορφη είναι η πλήρωση της στήλης (packing) και κατά συνέπεια τόσο πιο καλή η διαχωριστική ικανότητα της. Η παρουσία μεγαλύτερου μεγέθους σωματιδίων επηρεάζει τη διαχωριστική ικανότητα της στήλης, ενώ η παρουσία πολύ μικρότερων σωματιδίων από 1 μm μπορεί να οδηγήσει σε απόφραξη της φρίτας της στήλης και αύξηση της πίεσής της.

Η συμπεριφορά συγκράτησης των ενώσεων στη χρωματογραφία προσρόφησης οφείλεται κυρίως στη χημική κατάσταση της επιφάνειας του διοξειδίου του πυριτίου. Οι σιλανολικές ομάδες είναι ελαφρώς όξινες. Οι περισσότερες από τις χρωματογραφικές ιδιότητες της επιφάνειας του διοξειδίου του πυριτίου σχετίζονται με τις αλληλεπιδράσεις των διαχωριζόμενων ενώσεων με τις σιλανολικές ομάδες, αν και οι δεσμευμένες με δεσμούς υδρογόνου σιλανόλες μπορούν να συνεισφέρουν στη δραστικότητα της επιφάνειας.

Η φυσική προσρόφηση, συνήθως, συμβαίνει διαμέσου των δυνάμεων έλξης και απώθησης της επιφάνειας. Διακρίνονται οι εξής αλληλεπιδράσεις :

- Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (διασποράς).
- Δυνάμεις διασποράς τύπου London, από έλξεις μεταξύ επαγωγικών διπόλων.
- Αλληλεπιδράσεις μεταξύ επαγωγικών ή μόνιμων διπόλων με το ηλεκτρικό πεδίο της προσροφητικής επιφάνειας.
- Μεταφορά φορτίου μεταξύ των προσροφημένων μορίων και της επιφάνειας του προσροφητικού.

Στην HPLC οι επιφανειακές αλληλεπιδράσεις είναι πάντα ανταγωνιστικές. Το προσροφητικό υλικό είναι σε συνεχή επαφή με την κινητή φάση και τα μόρια του εκλουστικού αλληλεπιδρούν με τις θέσεις προσρόφησης της επιφάνειας, σύμφωνα με τη δομή τους, την πολικότητα και τον ιονισμό τους. Τα προς ανάλυση μόρια θα προσροφηθούν στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου, μόνο αν οι αλληλεπιδράσεις τους είναι πιο ισχυρές απ' αυτές των μορίων του εκλουστικού. Κάθε μέθοδος HPLC έχει τον δικό της τύπο αλληλεπιδράσεων. Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης επικρατούν μη-συγκεκριμένες υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. (hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book).

Χημικώς τροποποιημένα υλικά πλήρωσης

Η χημική τροποποίηση της επιφάνειας του διοξειδίου του πυριτίου αφορά σ' όλες τις διαδικασίες, που οδηγούν σε αλλαγή της χημικής σύστασης της επιφάνειας. Δύο βασικοί τύποι χημικής τροποποίησης μπορούν να διακριθούν :

1) Φυσική επεξεργασία (θερμική ή υδροθερμική), η οποία οδηγεί σε αλλαγή της συγκέντρωσης και της αναλογίας των σιλανολικών και των σιλοξανικών ομάδων της επιφάνειας.

2) Χημική επεξεργασία, όπου χημικά δεσμευμένοι οργανικοί υποκαταστάτες αλλάζουν σημαντικά τις προσροφητικές ιδιότητες της επιφάνειας του διοξειδίου του πυριτίου.

Στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου μπορούν να δεσμευτούν διάφορες ομάδες. Οι πιο συνηθισμένες είναι τα αλκύλια, με 18 άτομα άνθρακα (-C₁₈H₃₇) ή με 8 άτομα άνθρακα (C₈H₁₇), φαινύλια και ομάδες κυανίου. Οι ομάδες αυτές μπορούν να δεσμευτούν με διάφορους τρόπους και να δημιουργήσουν μια μη πολική επιφάνεια. Διακρίνονται οι παρακάτω τύποι δεσμών :

-Si-R: Η ομάδα R δεσμεύεται απευθείας με τα άτομα πυριτίου της επιφάνειας. Αυτός ο τύπος τροποποίησης της επιφάνειας είναι συνήθως πολύπλοκος και δε δίνει σταθερά τροποποιημένες επιφάνειες.

Si-O-R: Είναι ένας εσωτερικού τύπου δεσμός, ο οποίος σχηματίζεται εύκολα κατά την αντίδραση μιας αλκοόλης και των επιφανειακών υδροξυλίων.

Si-O-Si-R: Αυτή η δομή προκύπτει από την επεξεργασία της υδροξυλιωμένης επιφάνειας του διοξειδίου του πυριτίου με οργανοσιλανολικές ενώσεις του τύπου RnSiX_{4-n}, όπου X είναι μια ενεργή ομάδα όπως αλογόνο-, αιθοξυ- ή μεθοξυ- ομάδα. Αυτός ο τύπος δεσμευμένων υποκαταστατών είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος στην HPLC. Παρακάτω αναφέρονται οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες δεσμευμένες φάσεις.

C1, C4, C8, C18: Τα τροποποιημένα προσροφητικά με τριμεθυλοχλω-ροσιλάνια (C1) και με βουτυλοδιμεθυλοσιλάνια (C4) έχουν λίγες εφαρμογές στην HPLC, κυρίως στον διαχωρισμό πρωτεϊνών ή στον καθαρισμό τους. Αυτά τα προσροφητικά έχουν έντονες πολικές αλληλεπιδράσεις. Τα C8 και C18 τροποποιημένα προσροφητικά υλικά χρησιμοποιούνται σχεδόν για το 80 % των προσδιορισμών με HPLC.

Phenyl: Οι υποκαταστάτες προπυλοφαινυλοσιλανίου δεσμευμένοι στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου εμφανίζουν ασθενείς δεσμούς διπόλου - επαγωγικού διπόλου με

πολικές ενώσεις. Χρησιμοποιούνται συνήθως για διαχωρισμούς ομάδων σε πολύπλοκα δείγματα.

NH₂: Οι αμινο- τροποποιημένες επιφάνειες είναι ασθενείς ανιονικοί ανταλλάκτες. Ο τύπος αυτός των στηλών χρησιμοποιείται κυρίως στη χρωματογραφία κανονικής φάσης, για την επιλεκτική συγκράτηση αρωματικών ενώσεων.

CN: Οι κυανο-τροποποιημένες επιφάνειες είναι ασθενώς πολικές. Οι στήλες αυτού του τύπου χρησιμοποιούνται για τον ταχύ διαχωρισμό μιγμάτων τα οποία σε κανονικές στήλες έχουν μεγάλους χρόνους συγκράτησης (hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book).

2.7.6 Ανιχνευτές

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην HPLC πρέπει να λειτουργούν με υψηλή ακρίβεια, ευαισθησία και σταθερότητα. Ένας ιδανικός χρωματογραφικός ανιχνευτής πρέπει να παρουσιάζει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά :

- 1) Να έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει ένα μέρος (ή και λιγότερο) της προσδιοριζόμενης ένωσης μέσα σε ένα εκατομμύριο μέρη εκλουστικού.
- 2) Να μην προκαλεί ανακατάταξη των ζωνών των συστατικών του μίγματος.
- 3) Να έχει μεγάλη γραμμική περιοχή, ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί ικανοποιητική ποσοτική ανάλυση.
- 4) Να έχει χαμηλά επίπεδα θορύβου και μετατόπισης της βασικής γραμμής.
- 5) Να έχει μικρό χρόνο απόκρισης, ώστε να μπορεί να καταγράφει τις κορυφές που εκλούνται γρήγορα.
- 6) Να μην επηρεάζεται από αλλαγές της ταχύτητας ροής και της θερμοκρασίας.
- 7) Να μην επηρεάζεται από τις αλλαγές της σύστασης του εκλουστικού, ώστε να επιτρέπει τη βαθμιδωτή έκλυση.
- 8) Να έχει μικρό νεκρό όγκο, ώστε να μην προκαλεί διεύρυνση των κορυφών.
- 9) Να είναι αξιόπιστος και επαναλήψιμος.
- 10) Να είναι εύκολος στη χρήση, να υπάρχει δυνατότητα ρύθμισης ώστε να βελτιστοποιείται η ανίχνευση των διαφόρων ενώσεων και να μπορεί να συντηρηθεί και να επισκευαστεί εύκολα και τέλος

11) Να μην καταστρέφει το δείγμα.

Στην πραγματικότητα δεν υπάρχει κάποιος ανιχνευτής που να πληρεί όλες τις παραπάνω προϋποθέσεις. Δεν υπάρχει ουσιαστικά καθολικός ανιχνευτής, υπάρχουν όμως αρκετοί τύποι ανιχνευτών σήμερα, οι οποίοι επιτρέπουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι ανιχνευτών :

α) Ανιχνευτές οι οποίοι ανιχνεύουν μια συγκεκριμένη ιδιότητα της προσδιοριζόμενης ένωσης π.χ. ανιχνευτές υπεριώδους / ορατού, φθορισμομετρικοί.

β) Ανιχνευτές οι οποίοι μετρούν τη διαφορά σήματος μεταξύ της κινητής φάσης και της προσδιοριζόμενης ένωσης π.χ. ανιχνευτές δείκτη διάθλασης.

γ) Ανιχνευτές οι οποίοι διαχωρίζουν το δείγμα από το εκλουστικό, πριν από την ανίχνευση π.χ. φασματογράφοι μαζών.

Στον Πίνακα 2.5 συγκρίνονται τα βασικά χαρακτηριστικά των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων ανιχνευτών στην HPLC. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν οι ανιχνευτές υπεριώδους και φασματογράφος μάζας συνεπώς θα αναλυθούν αυτά τα δύο είδη ανιχνευτών.

Πίνακας 2.5 : Βασικά χαρακτηριστικά των κυριότερων ανιχνευτών στην HPLC.

Ανιχνευτής	Είδος	Γραμμική περιοχή	Όριο ανίχνευσης (g/mL)	Ευαισθησία στη ροή	Δυνατότητα βαθμιδωτής έκλουσης
Υπεριώδους (UV)	Ειδικός	10^3	10^{-10}	Όχι	Ναι
Δείκτη διάθλασης (RI)	Καθολικός	10^4	10^{-7}	Ναι	Όχι
Φθορισμομετρικός	Ειδικός	10^3	10^{-12}	Όχι	Ναι
Ηλεκτροχημικός	Ειδικός	10^6	10^{-11}	Ναι	Όχι
Φασματογράφος μαζών	Καθολικός	10^3	10^{-10}	Όχι	Ναι

Ανιχνευτές Παράταξης Φωτοδιόδων

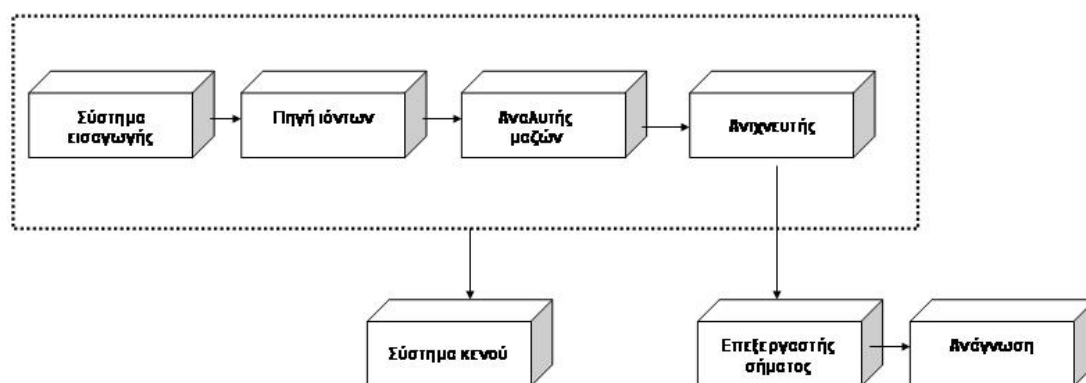
Με τον ανιχνευτή σειράς φωτοδιοδίων (photodiode array) διέρχεται πολυχρωματική ακτινοβολία από την κυψελίδα του ανιχνευτή, η προκύπτουσα ακτινοβολία διαθλάται και στη συνέχεια προσπίπτει σε σειρά φωτοδιοδών. Κάθε μία φωτοδίοδος δέχεται μία διαφορετική δέσμη με μικρό εύρος μήκους κύματος. Όλη η σειρά των διοδών «σαρώνεται» πολλές φορές το δευτερόλεπτο από έναν μικροεπεξεργαστή και το προκύπτον φάσμα προβάλλεται σε οθόνη και ταυτόχρονα αποθηκεύεται στη μνήμη ηλεκτρονικού υπολογιστή για μετέπειτα εκτύπωση σε καταγραφικό. Ο υπολογιστής επιτρέπει την ταυτοποίηση της ουσίας συγκρίνοντας το φάσμα της με τα φάσματα που διαθέτει σε ειδικά αρχεία-βιβλιοθήκη. Η ανίχνευση μπορεί να γίνει σε ένα ή περισσότερα μήκη κύματος ταυτόχρονα, ενώ η καθαρότητα μιας χρωματογραφικής κορυφής, δηλαδή το κατά πόσον πρόκειται για μία ουσία ή όχι, μπορεί να ελεγχθεί από τους λόγους των απορροφήσεων σε επιλεγμένα μήκη κύματος (πχ. 254nm και 280nm) (http://www.env.uoi.gr/web_lessons).

Φασματομετρία Μαζών

Το φασματόμετρο μαζών μπορεί να διευκολύνει την ανάπτυξη μιας μεθόδου HPLC με :

- Την ανίχνευση και την ταυτοποίηση μεμονωμένων κορυφών του χρωματογραφήματος μεταξύ πειραμάτων.
- Τη διάκριση των κορυφών που μας ενδιαφέρουν από λιγότερο σπουδαίες ενώσεις ή παρεμποδίσεις.
- Την αναγνώριση ανεπιθύμητων και επικαλυπτόμενων κορυφών, που οφείλονται σε παρεμποδίσεις, ώστε να αποφευχθούν λάθη κατά την ανάπτυξη της μεθόδου.

Τα φασματόμετρα μαζών αποτελούνται από τρία μέρη: α) Την πηγή ιόντων, β) τον αναλυτή μάζας και γ) τον ανιχνευτή (Σχήμα 2.9). Σ' όλες τις τεχνικές MS η προσδιοριζόμενη ένωση πρώτα ιονίζεται στην πηγή, αφού το MS μπορεί να ανιχνεύει μόνο ιονισμένα μόρια. Τα ιόντα που έχουν συγκεκριμένο λόγο μάζας/φορτίου, (m/z), διαχωρίζονται και εστιάζονται στον αναλυτή μάζας. Η τελική, εστιασμένη ακτίνα προσκρούει στον ανιχνευτή, ο οποίος προσδιορίζει την ένταση της ακτίνας. Ο αναλυτής μπορεί να συγκριθεί με το πρίσμα ή τον μονοχρωμάτορα των φασματοφωτομέτρων, με τη διαφορά ότι διαχωρίζονται και εστιάζονται ιόντα με συγκεκριμένη αναλογία μάζας/φορτίου παρά φωτόνια ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος (Snyder, 1997).



Σχήμα 2.9 : Τμήματα ενός φασματομέτρου μαζών

Η επιλογή της πηγής ιόντων διαφοροποιεί τις διάφορες τεχνικές MS που εφαρμόζονται στην HPLC. Οι διάφορες πηγές ιόντων (μέθοδοι ιονισμού) που χρησιμοποιούνται είναι: Ο ιονισμός ηλεκτρονίων (Electron Ionization, EI), ο χημικός ιονισμός (Chemical Ionization, CI), ο χημικός ιονισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI), ο βομβαρδισμός ατόμων (Fast-Atom Bombardment, FAB), ο ηλεκτροψεκασμός (Electro-Spray Ionization, ESI), ο θερμοψεκασμός (Thermo-Spray, TSP) κ.ά. . Στην παρούσα εργασία η πηγή ιόντων που χρησιμοποιήθηκε είναι ο ηλεκτροψεκασμός που περιγράφεται στην *Παράγραφο 2.8*.

Οι αναλυτές μάζας διακρίνονται σε διάφορους τύπους, όπως οι αναλυτές μαγνητικής εκτροπής, οι αναλυτές μαγνητικού/ηλεκτροστατικού τομέα, οι τετραπολικοί αναλυτές (quadrupole), οι αναλυτές παγίδας ιόντων (ion trap), οι αναλυτές χρόνου πτήσης (time-of-flight) κ.ά. Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος αναλυτής μάζας, που χρησιμοποιείται στη σύζευξη της HPLC με το MS, είναι ο τετραπολικός αναλυτής, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα διατριβή.

2.7.7 Συστήματα καταγραφής αποτελεσμάτων

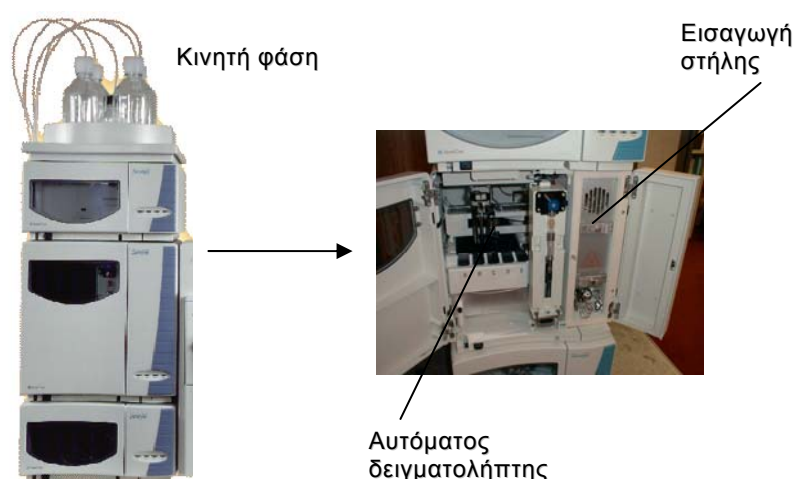
Τα καταγραφικά συστήματα αναλύουν και καταγράφουν τα ηλεκτρικά σήματα του ανιχνευτή με τη μορφή χρωματογραφημάτων. Η καταγραφή των χρωματογραφημάτων μπορεί να γίνει με απλό καταγραφικό σύστημα, ολοκληρωτή ή ηλεκτρονικό υπολογιστή. Στα χρωματογραφήματα, που καταγράφονται από ολοκληρωτές, εκτός από τις κορυφές δίνονται και άλλες πληροφορίες, όπως οι χρόνοι συγκράτησης των ενώσεων, το ύψος και το εμβαδόν των κορυφών κ.ά. Όταν χρησιμοποιείται ηλεκτρονικός υπολογιστής, δίνεται η δυνατότητα αποθήκευσης των χρωματογραφημάτων στη μνήμη του για περαιτέρω επεξεργασία τους και

ταυτόχρονα η δυνατότητα παρέμβασης στον τρόπο ολοκλήρωσης με μετατόπιση των ορίων ολοκλήρωσης, κάτι το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό όταν αναλύονται πολύπλοκα δείγματα σε αναλύσεις ρουτίνας.

2.8 Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με Ηλεκτροψεκασμό και Διαδοχική Φασματομετρία Μαζών (HPLC-ESI-MS/MS).

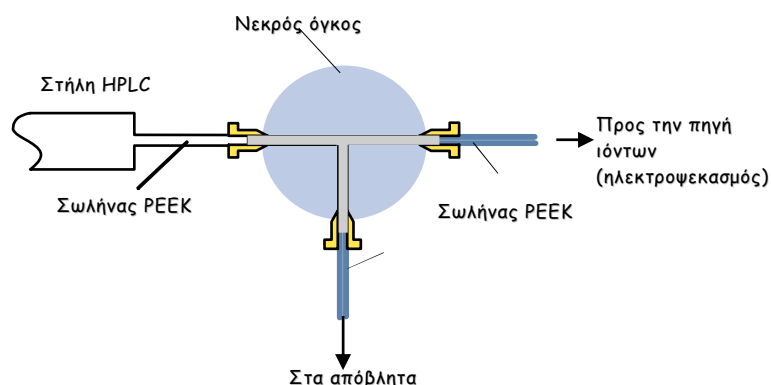
Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) που χρησιμοποιείται στην παρούσα διατριβή είναι της κατασκευάστριας εταιρείας Thermo Finnigan (San Jose , USA) (Σχήμα 2.10).

Αποτελείται από μια αντλία (HPLC Pump) και έναν αυτόματο δειγματολήπτη (Surveyor AS, Thermo Finnigan) (Σχήμα 2.10). Η ανάλυση των συστατικών του δείγματος γίνεται με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, χρησιμοποιώντας αναλυτική στήλη Hypersil BDS C8 μήκους 25 cm, εσωτερικής διαμέτρου 4.0 mm, με υλικό πλήρωσης μεγέθους 5 μm , στους 45 $^{\circ}\text{C}$ και ταχύτητα ροής 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$. Ο εισαγόμενος όγκος του δείγματος επιλέχθηκε στα 20 μl . Η έκλουση των συστατικών του δείγματος από την αναλυτική στήλη πραγματοποιείται ισοκρατικά, με αναλογία μεθανόλης υπερκάθαρου νερού 52/48 και 0,1% οξικό οξύ.



Σχήμα 2.10 : Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) της κατασκευάστριας εταιρείας Thermo Finnigan.

Μετά την έκλυση των συστατικών του δείγματος από την αναλυτική στήλη και πριν την εισαγωγή τους στον ηλεκτροψεκασμό παρεμβάλλεται ένας διακλαδωτής ροής (*post-column flow-splitting device*) (Σχήμα 2.11). Ο διακλαδωτής ροής είναι ένα βοηθητικό εξάρτημα σε σχήμα T, που επιτρέπει στο 28,7 % του εκλούσματος να συνεχίσει τη ροή του προς τον ηλεκτροψεκασμό με ροή 230 $\mu\text{l}/\text{min}$, ενώ το υπόλοιπο μέρος καταλήγει στα απόβλητα. Αυτό συμβαίνει γιατί η ταχύτητα ροής του δείγματος επηρεάζει την αποδοτικότητα του ηλεκτροψεκασμού. Μικρές ταχύτητες ροής βελτιώνουν την ποιότητα του σήματος και την απόδοση του ηλεκτροψεκασμού, με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου φασματομετρίας μάζας (Gaskell, 1997).



Σχήμα 2.11 : Διακλαδωτής ροής (*Thermo Finnigan*)

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 σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας. Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού χρησιμοποιείται ευρέως για πολικές ή θερμικά ασταθής ενώσεις καθώς και για ενώσεις με μεγάλο μοριακό βάρος.

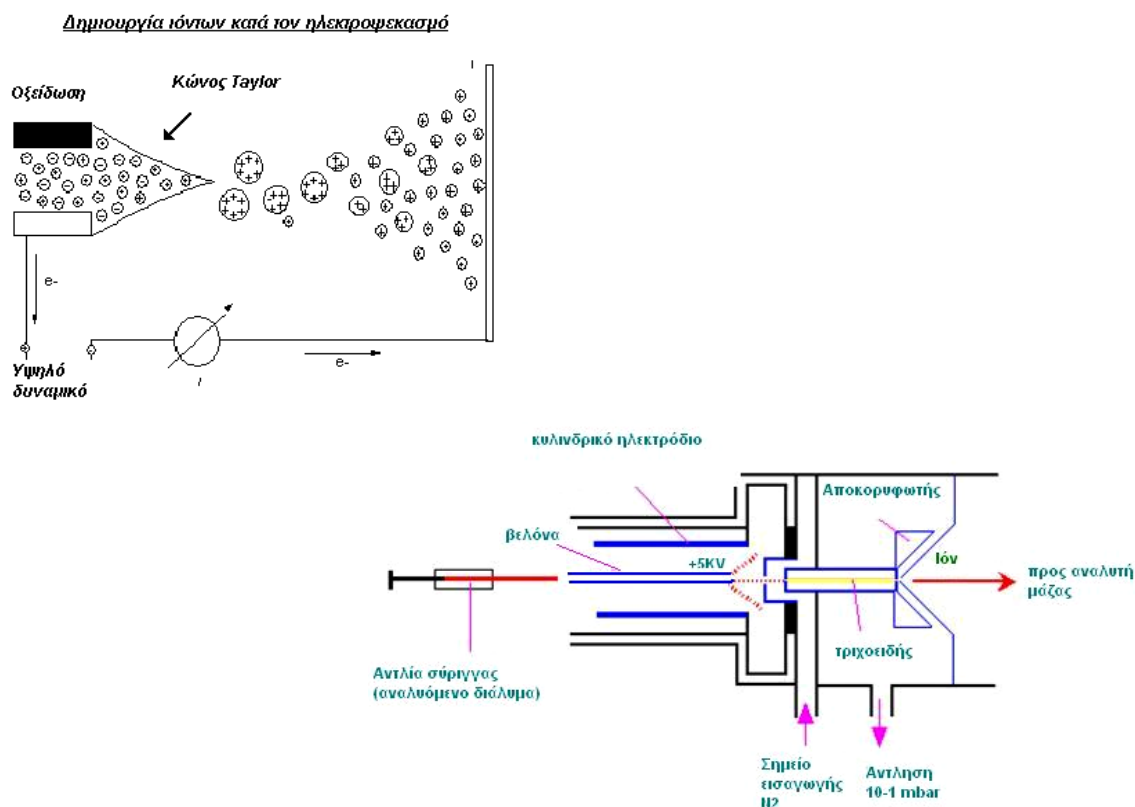
Κατά τον ηλεκτροψεκασμό διαλύματος, τα εντός του διαλύματος ιόντα της προσδιοριζόμενης ουσίας μεταβαίνουν στην αέρια κατάσταση. Η διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια:

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 με αποτέλεσμα να έχουμε υψηλή τάση στην άκρη της βελόνας. Στην παρούσα εργασία εφαρμόζεται θετικό δυναμικό, έτσι τα εντός του διαλύματος θετικά ιόντα συσσωρεύονται στην επιφάνεια με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν έναν κώνο (Taylor cone). Σε αρκούντως ισχυρό πεδίο, όταν η εφαρμοζόμενη ηλεκτροστατική δύναμη υπερβεί την επιφανειακή τάση του διαλύτη ο κώνος παράγει θετικά φορτισμένες σταγόνες. Η διάμετρος της σταγόνας εξαρτάται από το εφαρμοζόμενο δυναμικό, την ταχύτητα ροής του διαλύματος και τη φύση του διαλύτη (Cole, 1997).

Καθώς το νέφος από σταγόνες διασχίζει μια βαθμιδωτή μεταβολή της πίεσης προς την κατεύθυνση του αναλυτή μάζας, ο διαλύτης εξατμίζεται από τις αρχικά σχηματιζόμενες σταγόνες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα η διάμετρος της σταγόνας να μειώνεται με ταυτόχρονη αύξηση της πυκνότητας φορτίου στην επιφάνειά της. Η πυκνότητα φορτίου στην επιφάνεια κάθε σταγόνας αυξάνει συνεχώς μέχρι ενός κρίσιμου σημείου, πού είναι γνωστό ως όριο Rayleigh. Στο κρίσιμο αυτό σημείο, πραγματοποιείται η σχάση της σταγόνας (σχάση Coulomb) σε μικρότερα σταγονίδια διότι η ηλεκτροστατική άπωση έχει υπερβεί την επιφανειακή τάση που κρατάει ενωμένη τη σταγόνα. Στη συνέχεια πραγματοποιείται περαιτέρω εξάτμιση του διαλύτη και σχάσεις, 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 2.12 που ακολουθεί δίνεται σχηματική παράσταση των σπουδαιότερων φαινομένων τα οποία συμβαίνουν κατά τον ηλεκτροψεκασμό.



Σχήμα 2.12 : Σχηματική παράσταση σπουδαιότερων φαινομένων τα οποία συμβαίνουν κατά τον ηλεκτροψεκασμό (Stephanou,2004).

Στην παρούσα εργασία 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 υπό ατμοσφαιρική πίεση. Η πίεση του αερίου εκνέφωσης έχει επιλεγεί στην τιμή των 45 μονάδων και του βοηθητικού αερίου στην τιμή των 10 μονάδων.

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 (Πίνακας 2.6).

Πίνακας 2.6 : Συνθήκες ηλεκτροψεκασμού

	Τιμή
Εφαρμοζόμενο δυναμικό στη βελόνα ηλεκτροψεκασμού (V)	5000
Πίεση αερίου εκνέφωσης	45
Πίεση αερίου ξήρασης	15
Θερμοκρασία τριχοειδή	300

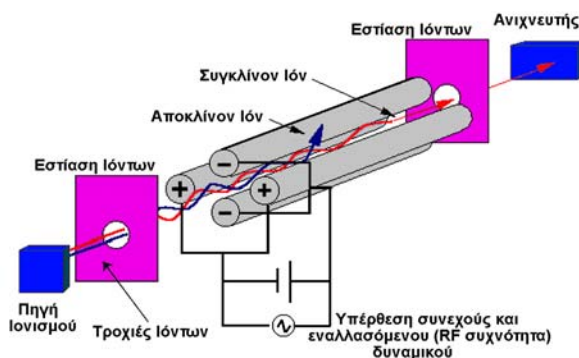
Φασματομετρία Μάζας

Ο συνηθέστερος τύπος φασματομέτρου μαζών είναι ο τετραπολικός αναλυτής μαζών ο οποίος απεικονίζεται στο *Σχήμα 2.13*. Το όργανο αυτό έχει μικρό μέγεθος, μικρότερο κόστος και είναι μηχανικά ανθεκτικότερο από τους περισσότερους τύπους φασματομέτρων μαζών. Επίσης έχει το πλεονέκτημα των υψηλών ταχυτήτων σάρωσης ώστε ολόκληρο το φάσμα μαζών να λαμβάνεται σε χρόνο μικρότερο των 100ms.

Το τετράπολο αποτελείται από τέσσερις παράλληλες κυλινδρικές ράβδοι οι οποίες δρουν σαν ηλεκτρόδια. Οι διαγώνιες ράβδοι συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Το ένα ζεύγος συνδέεται με τον θετικό πόλο μιας πηγής μεταβλητής τάσης DC, ενώ το άλλο με τον αρνητικό πόλο της πηγής. Επιπλέον σε κάθε ζεύγος ράβδων εφαρμόζονται μεταβλητές τάσεις AC (με συχνότητα στην περιοχή ραδιοσυχνοτήτων), που μεταξύ τους βρίσκονται σε διαφορά φάσης 180°. Για να ληφθεί το φάσμα μαζών μ' αυτή τη συσκευή, τα ιόντα επιταχύνονται στο χώρο ανάμεσα στις ράβδους με ένα δυναμικό 5 έως 10 V. Τα εναλλασσόμενα συνεχή και δυναμικά των ράβδων αυξάνουν συγχρόνως διατηρώντας όμως τον λόγο τους σταθερό. Σε κάποια χρονική στιγμή όλα τα ιόντα, εκτός από αυτά που έχουν μια συγκεκριμένη τιμή λόγου m/z , φθάνουν στις ράβδους και μετατρέπονται σε ουδέτερα μόρια. Έτσι φθάνουν στον ανιχνευτή μόνο τα ιόντα, των οποίων οι τιμές m/z βρίσκονται σε μια στενή περιοχή τιμών λόγου m/z (Skoog, 2002).

Αναλυτικά, όταν δύο θετικά φορτισμένα σωματίδια διέρχονται μέσω του τετραπόλου παρουσία μόνο εναλλασσόμενου ρεύματος, είτε θα συγκλίνουν στο κέντρο όταν οι δυο πόλοι είναι φορτισμένοι θετικά, είτε θα πλησιάζουν στους πόλους όταν αυτοί είναι φορτισμένοι αρνητικά. Αν κάποιο ιόν χτυπήσει στον αντίθετα φορτισμένο πόλο, αποφορτίζεται και ως ουδέτερο μόριο, απομακρύνεται από το σύστημα κενού. Με την παράλληλη εφαρμογή θετικού συνεχούς ρεύματος σε κάθετο επίπεδο ως προς το εναλλασσόμενο ρεύμα, ιόντα με

μεγάλη μάζα θα ανταποκριθούν σχετικά αργά στις αλλαγές του εναλλασσόμενου ρεύματος. Αντίθετα, ελαφρύτερα μόρια λόγω αδράνειας μάζας, εκτρέπονται της πορείας τους και προσκρούουν στους αντίθετα φορτισμένους πόλους. Άρα οι θετικοί πόλοι λειτουργούν ως φίλτρα που δεν επιτρέπουν σε ιόντα με λόγο m/z χαμηλότερο από τον καθορισμένο, να περάσουν το τετράπολο. Εξετάζοντας τώρα τους αρνητικούς πόλους, απουσία εναλλασσόμενου ρεύματος, τα θετικά ιόντα θα συγκλίνουν προς αυτούς όπου προσκρούουν και εξουδετερώνονται. Η παράλληλη εφαρμογή του εναλλασσόμενου ρεύματος, αντισταθμίζει την κίνηση αυτή των ελαφρύτερων ιόντων, όμως τα βαρύτερα ιόντα τελικά εξουδετερώνονται στους πόλους και έτσι οι αρνητικοί πόλοι, λειτουργούν ως φίλτρα υψηλών μαζών. Ο κατάλληλος συνδυασμός των δύο τάσεων επιτρέπει τελικά σε ιόντα συγκεκριμένου μόνο λόγου m/z να περάσουν το τετράπολο κινούμενα σε ελικοειδείς τροχιές και να φτάσουν στον ανιχνευτή. Η σάρωση των δυναμικών του εναλλασσόμενου και του συνεχούς ρεύματος σε έναν τετραπολικό αναλυτή, με σταθερό λόγο περίπου 6, ξεκινάει από τιμές μηδέν και φτάνει ως μια μέγιστη τιμή ($\pm 250V$ για το συνεχές και $\pm 1500V$ για το εναλλασσόμενο). Κάθε ζεύγος τιμών δυναμικού συνεχούς και εναλλασσόμενου ρεύματος, αντιστοιχεί και σε μια τιμή m/z η οποία θα περάσει από το τετράπολο.

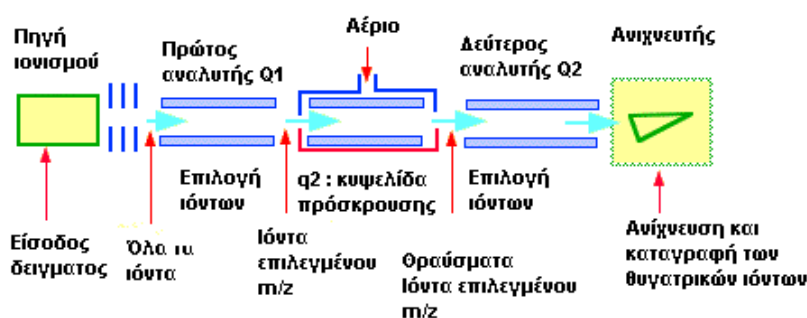


Σχήμα 2.13 : Σχηματική αναπαράσταση τετραπόλου (Stephanou,2004).

Το σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή είναι συνδυασμένο με ένα φασματόμετρο μάζας, που φέρει τρία τετράπολα (TSQ Quantum , Thermo Finnigan). Πρόκειται για μια γραμμική διάταξη και παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.14.

Το δείγμα εισάγεται στην πηγή ιοντισμού και τα ιόντα επιταχύνονται και οδηγούνται στο πρώτο στάδιο ανάλυσης ή στον διαχωριστή μητρικού ιόντος που είναι συνήθως ένα τετραπολικό φίλτρο. Τα διαχωρισμένα ιόντα με μεγάλες πλέον ταχύτητες οδηγούνται στο τετράπολο 2, το οποίο είναι ένας θάλαμος προσκρούσεων, όπου συμβαίνει περαιτέρω ιοντισμός των μητρικών ιόντων που παράγονται στο Q_1 . Αυτό το τετράπολο λειτουργεί μόνο με ραδιοσυχνότητες,

δηλαδή δεν εφαρμόζεται συνεχές δυναμικό μεταξύ των ράβδων. Αυτός ο τρόπος λειτουργίας παρέχει έναν αποτελεσματικό τρόπο εστίασης των σκεδαζόμενων ιόντων, αλλά δε λειτουργεί ως φίλτρο μαζών. Στο θάλαμο αυτό εισάγεται αργό υψηλής καθαρότητας (99.999%) που περιέχεται σε μεταλλική ανοξείδωτη φιάλη και η πίεση έχει ρυθμιστεί στο 1mTorr. Εδώ συνεχίζεται ο ιοντισμός ως αποτέλεσμα των προσκρούσεων των μητρικών ιόντων μεγάλων ταχυτήτων και των ατόμων αργού. Τα παραγόμενα θυγατρικά ιόντα εισέρχονται στο τρίτο τετράπλοιο (Q_2), όπου σαρώνονται και καταγράφονται.



Σχήμα 2.14 : Σχηματική αναπαράσταση φασματομέτρου μαζών με τρία τετράπλοια (Stephanou, 2004)

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε σε αυτή την εργασία για τον προσδιορισμό της παρουσίας των βενζοθειαζολίων σε υγρά απόβλητα καθώς και σε κάποια εμπορικά προϊόντα, στηρίζεται στην παρακολούθηση 12 μεταβάσεων μάζας (MS-MS transitions) στη διάρκεια της ισοκρατικής έκλουσης του δείγματος. Το είδος σάρωσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η παρακολούθηση χαρακτηριστικών αντιδράσεων (SRM, selected reaction monitoring), όπου παρακολουθείται η θραύση 6 πρόδρομων ιόντων. Η τεχνική της παρακολούθησης μιας χαρακτηριστικής αντίδρασης (SRM), η οποία εφαρμόστηκε στην εργασία αυτή αναπτύσσεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 3. Η προτεινόμενη μέθοδος περιλαμβάνει 12 γεγονότα σάρωσης (scan events). Κάθε σάρωση προγραμματίζεται ξεχωριστά για τις παραμέτρους λειτουργίας του.

Οι βέλτιστες τιμές ενέργειας πρόσκρουσης (collision energy) και δυναμικού κυλινδρικού φακού (Tube Lens Offset) προσδιορίστηκαν χωριστά για κάθε αναλυόμενη ένωση. 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.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΚΕΦ 3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

3.1 Μέθοδος Υγρής Χρωματογραφικής Ανάλυσης

Ένας χρωματογραφικός διαχωρισμός βελτιστοποιείται με ρύθμιση πειραματικών συνθηκών έτσι ώστε τα συστατικά ενός μίγματος να διαχωρίζονται καθαρά και στο συντομότερο δυνατό χρονικό διάστημα. Τα πειράματα βελτιστοποίησης αποβλέπουν στη μείωση της διεύρυνσης των ζωνών ή στη μεταβολή των σχετικών ταχυτήτων μετανάστευσης των συστατικών.

Στην παρούσα διατριβή ο διαχωρισμός των βενζοθειαζολίων πραγματοποιήθηκε αρχικά σε στήλη MZ-PAH, C-18, με διαστάσεις 250x4,0 mm και διάμετρο σωματιδίων 5 μm και έγινε ορατός με ανίχνευση στο UV σε μήκος κύματος 224 nm (απορρόφηση) για όλες τις ενώσεις εκτός από το 2-μερκαπτοβενζοθειαζόλιο (MBT) που ανιχνεύεται στα 324 nm. Το υγρό έκλουσης (κινητή φάση), η ροή του οποίου ρυθμίστηκε στο 1 ml/min, αποτελείται από τα εξής μέρη :

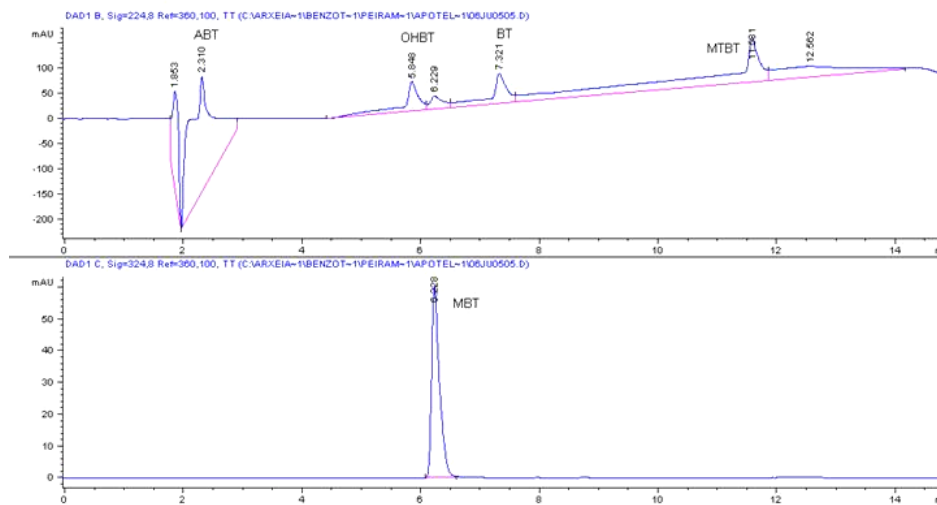
- (A) : 80 H₂O + 20 CH₃OH + 0,1% HCOOH
- (D) : 90 CH₃OH + 10 H₂O + 0,1% HCOOH

Για την έκλουση των βενζοθειαζολίων εφαρμόστηκε αρχικά η παρακάτω (Πίνακας 3.1) βαθμιδωτή (gradient) μέθοδος υπό θερμοκρασία στήλης 45° C.

Πίνακας 3.1 : Πρόγραμμα έκλουσης Υγρής Χρωματογραφίας Αντίστροφης Φάσης

Χρόνος(min)	%D	Ροή (ml/min)
0.00	30	1.00
2.00	80	1.00
10.00	80	1.00
12.00	30	1.00
15.00	30	1.00

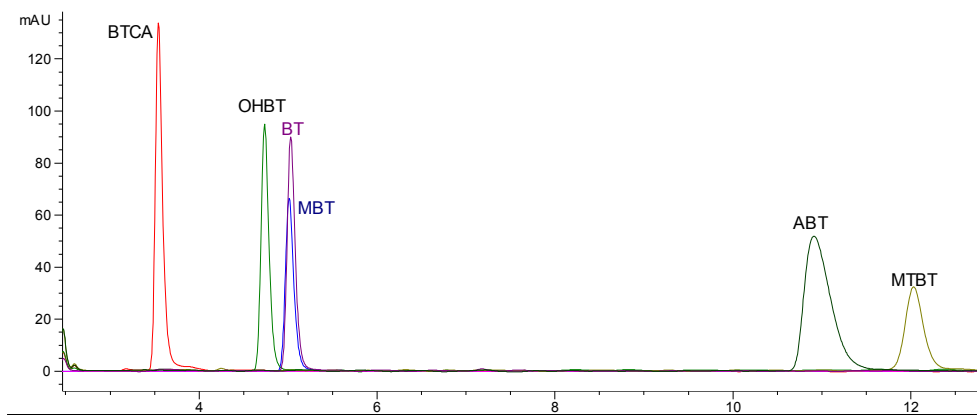
Η παραπάνω μέθοδος έκλουσης εκτός από το σχετικά σύντομο χρόνο διάρκειάς της έχει να επιδείξει επιτυχή διαχωρισμό των βενζοθειαζολίων όπως παρατηρείται από το *Χρωματογράφημα 3.1*. Ο χρόνος έκλουσης για τα ABT, OHBT, MBT, BT, MTBT είναι 2,3, 5,8, 6,2, 7,3 και 11,6min αντίστοιχα. Όμως, το 2-αμινοβενζοθειαζόλιο (ABT) εκλούεται πολύ κοντά στο νεκρό χρόνο και επίσης παρατηρείται ένα ανεπιθύμητο ύψος της βασικής γραμμής (baseline). Συνεπώς η παραπάνω μέθοδος απορρίφθηκε και εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν πλήθος πειραμάτων με αλλαγή στη ροή, στη θερμοκρασία της στήλης, με χρήση άλλων αναλυτικών στηλών αντίστροφης φάσης, με αλλαγές στην κινητή φάση, στο χρόνο και άλλα.



Χρωματογράφημα 3.1 : Πρότυπο διάλυμα 4ppm (βαθμιδωτή έκλουση, στήλη MZ-PAH, C-18, με διαστάσεις 250x4,0 mm και διάμετρο σωματιδίων 5 μm)

Τελικά, η ανάλυση των συστατικών του δείγματος στην παρούσα διατριβή γίνεται με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, χρησιμοποιώντας αναλυτική στήλη Hypersil BDS C8 μήκους 25 cm, εσωτερικής διαμέτρου 4.0 mm, με υλικό πλήρωσης μεγέθους 5 μm, στους 45 °C και ταχύτητα ροής 1000 μl/min. Η έκλουση των συστατικών του δείγματος από την αναλυτική στήλη πραγματοποιείται ισοκρατικά, με αναλογία μεθανόλης υπερκάθαρου νερού 52/48 και 0,1% οξικού οξέος.

Η διάρκεια του χρωματογραφήματος επιλέχθηκε στα 15 min. Η εικόνα που λαμβάνουμε χρησιμοποιώντας τις παραπάνω συνθήκες για ένα μίγμα βενζοθειαζολίων παρουσιάζεται στο *Χρωματογράφημα 3.2*. Στο χρωματογράφημα αυτό, παρατηρείται καλός διαχωρισμός των βενζοθειαζολίων καθώς και το πρόβλημα του ανεπιθύμητου ύψους της βασικής γραμμής έχει λυθεί, δεν υπάρχει κάλυψη των κορυφών και το ABT δεν εκλούεται στο νεκρό χρόνο (*Πίνακας 3.2*).



Χρωματογράφημα 3.2 : Πρότυπο διάλυμα βενζοθειαζολίων συγκέντρωσης 5ppm (ισοκρατική έκλουση, στήλη Hypersil BDS C₈ 25 cm, 4.0 mm, 5 μm)

Πίνακας 3.2 : Χρόνος έκλουσης κάθε ένωσης.

Ενώσεις	Χρόνος έκλουσης (min)
BTCA	3,5
OHBT	4,7
BT	5,1
MBT	5,1
ABT	11,0
MTBT	12,1

Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται από αυτόματο δειγματολήπτη (auto sampler). Για την λειτουργία αυτού έχει αναπτυχθεί πρόγραμμα που καθορίζει όλες τις παραμέτρους λειτουργίας του. Οι παράμετροι αυτές παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα :

Πίνακας 3.3 : Παράμετροι αυτόματου δειγματολήπτη

Παράμετρος	Τιμή
Εισαγόμενος όγκος δείγματος	20 μl
Απόσταση βελόνας από τον πυθμένα του Vial	2 mm
Ταχύτητα εισαγωγής του δείγματος	8 μl/s
Ταχύτητα έκπλυσης	250 μl/s
Μοντέλο εισαγωγής δείγματος	Πλήρης βρόγχος
Ταχύτητα τροφοδοσίας του δείγματος	8 μl/s
Θερμοκρασία στήλης	45 °C

Πέραν του προγράμματος λειτουργίας του αυτόματου δειγματολήπτη, έχει αναπτυχθεί και πρόγραμμα για το ξέπλυμα της σύριγγας, και αυτό ακολουθεί τη διαδικασία που περιγράφεται συνοπτικά στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 3.4):

Πίνακας 3.4 : Πρόγραμμα έκπλυσης της σύριγγας του αυτόματου δειγματολήπτη

Έκπλυση σύριγγας	
Όγκος διαλύτη έκπλυσης	Φιαλίδιο
400 μl	CH ₃ OH
400 μl	Φιάλη με διαλύτη έκπλυσης CH ₃ OH /H ₂ O=1/1

Η ακρίβεια εισαγωγής του δείγματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την καθαρότητα της σύριγγας συνεπώς το ξέπλυμα αυτής είναι απαραίτητο για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων. Παραμονή υπολειμμάτων 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 με μεθανόλη/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 τη λειτουργία του οργάνου (HPLC-ESI-MS/MS) λαμβάνεται πρόνοια για την απομάκρυνση φυσαλίδων αέρα από τους διαλύτες. Αυτό γίνεται με απαέρωση των χρησιμοποιούμενων διαλυτών, και εκδίωξη 20 ml περίπου από αυτούς στα απόβλητα.

3.2 Ηλεκτροψεκασμός

Για να αναπτυχθεί μια ευαίσθητη και εκλεκτική μέθοδος οι παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη είναι :

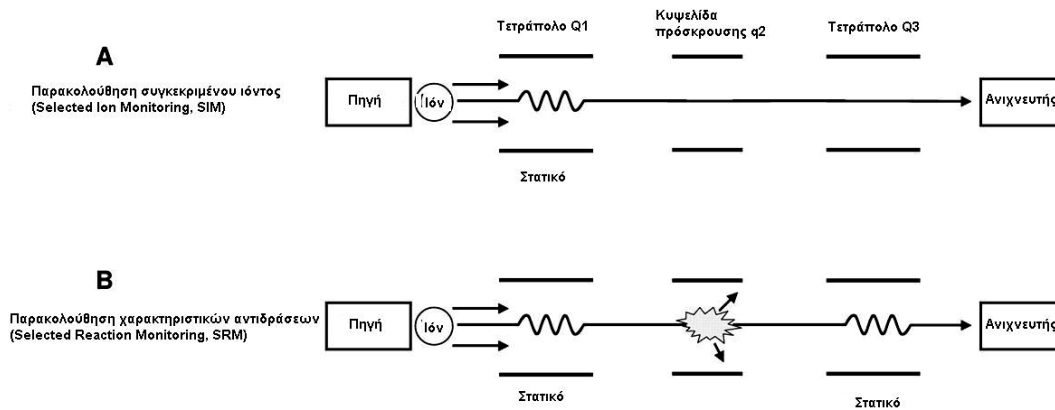
- Η σύσταση της κινητής φάσης : Κατάλληλοι θεωρούνται οι διαλύτες οι οποίοι έχουν σχετικά χαμηλή επιφανειακή τάση (π.χ. MeOH) ώστε να πραγματοποιείται σταθερός ηλεκτροψεκασμός.
- Οι χημικές ιδιότητες του αναλύτη : Όσο περισσότερο υδρόφοβο χαρακτήρα έχει ο αναλύτης τόσο πιο εύκολα εισέρχεται στην επιφάνεια της σταγόνας κατά τον

ηλεκτροψεκασμό. Αυτό συμβαίνει γιατί λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα του η συγγενεία του με την υδατική φάση είναι μειωμένη και συνεπώς ευνοείται η απομάκρυνσή του από τη φάση αυτή. Κατάλληλοι θεωρούνται οι αναλύτες οι οποίοι βρίσκονται υπό μορφή ιόντων στην υγρή φάση. Αυτό συμβάλλει σημαντικά στην αποδοτικότητα του ηλεκτροψεκασμού αφού η παρουσία ομάδων στον αναλύτη οι οποίες μπορούν να ιονισθούν επηρεάζει θετικά την απόκριση του συστήματος.

- Το δυναμικό ηλεκτροψεκασμού, το οποίο επηρεάζει τη μεταφορά ιόντων του αναλύτη από την υγρή φάση.
- Το δυναμικό το οποίο εφαρμόζεται στους φακούς εστίασης για τη βέλτιστη μεταφορά ιόντων από την πηγή ιοντισμού προς τον αναλυτή μάζας.
- Η επιλογή κατάλληλης μεθόδου σάρωσης στον αναλυτή μάζας (Καργάκη, 2006).

3.3 Τεχνική σάρωσης με μελέτη χαρακτηριστικών αντιδράσεων

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στη διατριβή αυτή, εφαρμόζει την τεχνική της παρακολούθησης χαρακτηριστικών αντιδράσεων (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 χρησιμοποιείται ευρύτητα 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 την κάθε υπό μελέτη ένωση (κατάλληλα διαλεγμένα με βάση τα δεδομένα των καμπυλών θραυσματοποίησης). Η δυνατότητα επιλογής παραπάνω από ένα ιόν σε κάθε ένωση που μελετάται, καθιστά τη μέθοδο αυτή ιδιαίτερα αποτελεσματική στην ανάλυση λόγω της εξαιρετικά μεγάλης ακρίβειάς της, σε αντίθεση με τη μέθοδο παρακολούθησης επιλεγμένου ιόντος (Selected Ion Monitoring, SIM) η οποία υστερεί σε εκλεκτικότητα και συνεπώς σε ακρίβεια (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1 : **A.** Μέθοδος παρακολούθησης συγκεκριμένου ιόντος (SIM), **B.** Μέθοδος παρακολούθησης χαρακτηριστικών αντιδράσεων (SRM) (Singh, 2006).

Η μέθοδος SIM είναι μια εναλλακτική μέθοδος σάρωσης, γενικά εφαρμόσιμη, κατά την οποία παρακολουθείται ένα χαρακτηριστικό ιόν ή μια ομάδα ιόντων 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 και 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. Μ' 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 για να λάβει χώρα μια διαδικασία SRM, καθιστά την τεχνική αυτή ένα πολύτιμο μέσο για την ανάλυση των ενώσεων.

3.4 Επιλογή θυγατρικών ιόντων και προσδιορισμός της βέλτιστης ενέργειας πρόσκρουσης και εφαρμοζόμενου δυναμικού κυλινδρικού φακού.

Σύμφωνα με τη δημοσίευση των Kloerfer A., Jekel M. και Reemtsma T. (2004) οι συνθήκες του οργάνου με τη μέθοδο παρακολούθησης χαρακτηριστικών αντιδράσεων για κάθε βενζοθειαζόλιο αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.5.

Πίνακας 3.5 : Παράμετροι στο φασματομέτρο μάζας για την ανίχνευση πέντε βενζοθειαζολίων χρησιμοποιώντας ηλεκτροψεκασμό σε θετική ή αρνητική λειτουργία σύμφωνα με τους Kloerfer και άλλων σε μελέτη του 2004.

Ενώσεις	Ακρωνύμιο	Μοριακό ión (m/z)	SRM Θυγατρικά iónτα	Ενέργεια πρόσκρουσης (eV)
Θετικός ιονισμός (M+H)⁺				
2-αμινοβενζοθειαζόλιο	ABT	151	109	26
			65	35
βενζοθειαζόλιο	BT	136	109	26
			65	37
2-μεθυλθειοβενζοθειαζόλιο	MTBT	182	109 65	22 34
Αρνητικός ιονισμός (M-H)⁻				
2-υδροξυβενζοθειαζόλιο	OHBT	150	107	24
			42	31
2-μερκαπτοβενζοθειαζόλιο	MBT	166	134	20
			58	32

Κατά το θετικό ιονισμό μπορούν να ανιχνευθούν όπως παρατηρείται στον Πίνακα 3.5 τα ABT, BT και MTBT.

Στις περισσότερες τεχνικές ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης πολλές φορές χρησιμοποιείται μια τεχνική ενίσχυσης σήματος που καλείται τεχνική διάσπασης επαγόμενης από σύγκρουση (**Collision-Induced Dissociation**). Η τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί και σε τετραπολικούς αναλυτές. Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, τα δημιουργούμενα ίοντα, πριν το διαχωρισμό τους αναγκάζονται να συγκρουστούν με μόρια κατάλληλου αδρανούς αερίου, σε ειδικά διαμορφωμένες κυψελίδες χαμηλής πίεσης (3×10^{-3} Torr) που βρίσκονται σε σημείο του οργάνου πριν το διαχωρισμό και είναι εφοδιασμένες με πολύ στενή είσοδο-έξοδο ιόντων. Με αυτόν τον τρόπο, τόσο το

λαμβανόμενο σήμα όσο και τα λαμβανόμενα θραύσματα που μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τη δομή της ένωσης, αυξάνονται σημαντικά.

Συνεπώς, για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου ελέγχθηκε ποια είναι η βέλτιστη ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή καθώς και το εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού (Παράρτημα I, Χρωματογραφήματα 1A-1 έως 1A-16) ώστε η κάθε ένωση να έχει τη μεγαλύτερη δυνατή αφθονία. Αρχικά παρατηρήθηκε η ένταση της κάθε κορυφής όταν η ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή είναι 1, 5, 10, 20, 30, 40 ή 50 V. Στον Πίνακα 3.6 παρουσιάζεται η ένταση της κάθε κορυφής, μεταβάλλοντας κάθε φορά την ενέργεια πρόσκρουσης. Στη συνέχεια, μετά την εύρεση της βέλτιστης ενέργειας πρόσκρουσης για κάθε ένωση στο θετικό ιοντισμό, ελέγχεται το εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού (Πίνακας 3.7). Τέλος, στον Πίνακα 3.8 παρουσιάζεται για την κάθε ένωση στη θετική λειτουργία το μοριακό και θυγατρικό ιόν καθώς και η βέλτιστη ενέργεια πρόσκρουσης και το βέλτιστο εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού που θα εφαρμοστούν στην παρούσα εργασία.

Πίνακας 3.6 : Έλεγχος σε πρότυπο διάλυμα 250 ppb για τη βελτιστοποίηση της ενέργειας πρόσκρουσης στη πηγή.

Ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή (V)	BT		ABT		MTBT	
	μοριακό ιόν m/z 136	μοριακό ιόν m/z 136	μοριακό ιόν m/z 151	μοριακό ιόν m/z 151	μοριακό ιόν m/z 182	μοριακό ιόν m/z 182
	SRM θυγατρικά ιόντα 109	SRM θυγατρικά ιόντα 65	SRM θυγατρικά ιόντα 109	SRM θυγατρικά ιόντα 65	SRM θυγατρικά ιόντα 109	SRM θυγατρικά ιόντα 65
	Ένταση κορυφής					
1	42700	25900	511000	248000	1500	1880
5	38000	21800	406000	203000	1920	4050
10	65400	38100	678000	342000	3380	1480
20	39000	23900	575000	354000	9600	6510
30	12200	10700	263000	212000	11100	6080
40	0	5,02	105000	99000	1840	1370
50	0	0	39800	0	0	0

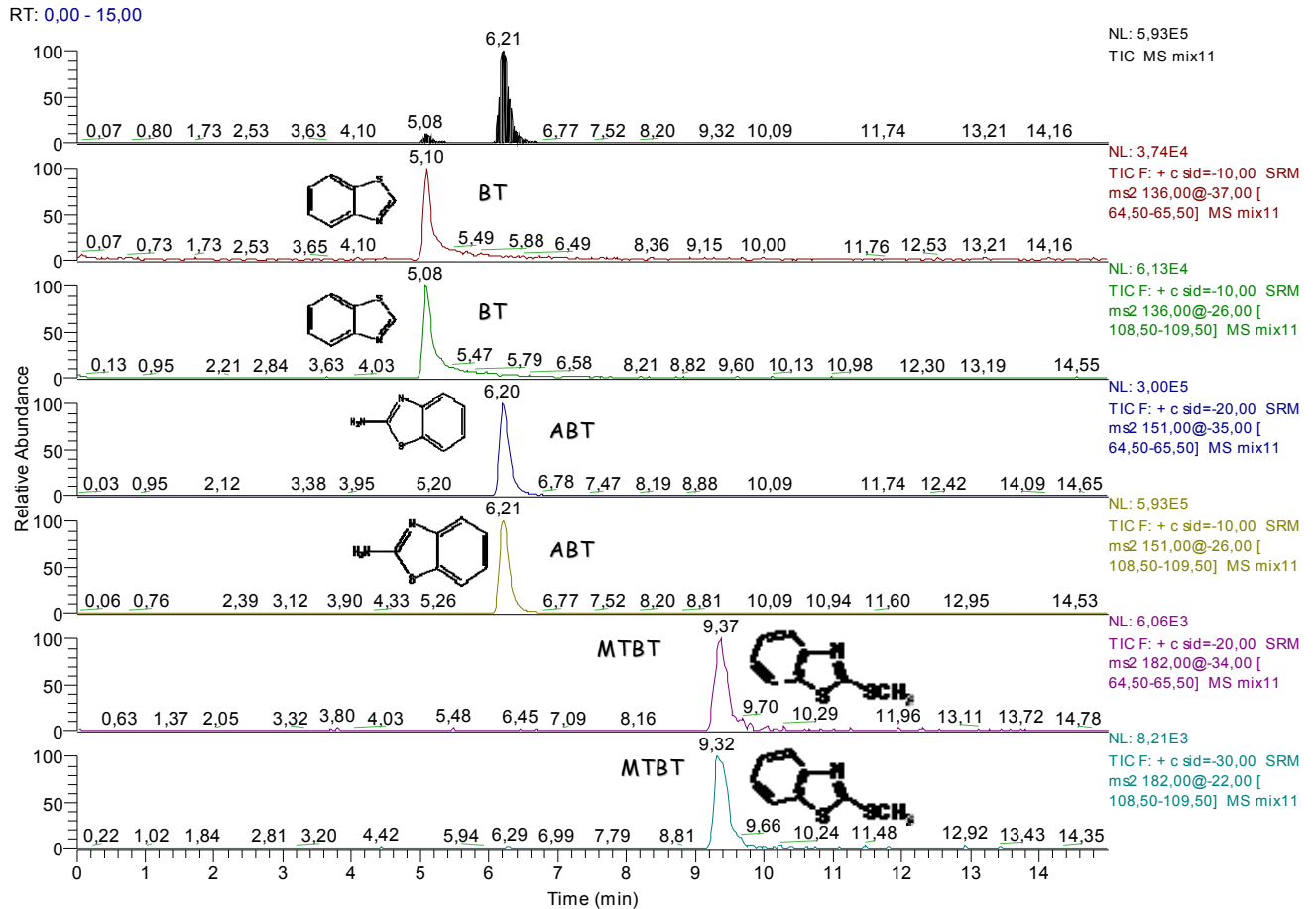
Πίνακας 3.7 : Έλεγχος σε πρότυπο διάλυμα 250ppb για τη βελτιστοποίηση του εφαρμοζόμενου δυναμικού κυλινδρικού φακού.

Εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού (V)	BT		ABT		MTBT	
	μοριακό ιόν m/z 136	SRM	μοριακό ιόν m/z 151	SRM	μοριακό ιόν m/z 182	SRM
	θυγατρικά ιόντα		θυγατρικά ιόντα		θυγατρικά ιόντα	
	109	65	109	65	109	65
αυτόματο	41200	24400	365000	200000	5480	3150
60	41900	22500	337000	187000	5800	4680
80	49400	27700	428000	227000	8410	5550
100	54100	28700	460000	247000	6370	5970
120	54200	32100	548000	279000	7580	5530
140	56000	32400	583000	301000	9580	6260
160	56600	32200	736000	370000	8640	5410

Πίνακας 3.8 : Βελτιστοποίηση ορισμένων παραμέτρων ώστε κάθε θυγατρικό ιόν να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αφθονία.

Ενώσεις	Ακρωνύμιο	Μοριακό ιόν	SRM	Ενέργεια πρόσκρουσης στην πηγή (source CID)	Εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού	Ενέργεια πρόσκρουσης
		(m/z)	θυγατρικά ιόντα	(V)	(V)	(eV)
Θετικός ιονισμός (M+H)⁺						
2-αμινοβενζοθειαζόλιο	ABT	151	109	10	160	26
			65	20	160	35
βενζοθειαζόλιο	BT	136	109	10	140	26
			65	10	140	37
2-μεθυλθειοβενζοθειαζόλιο	MTBT	182	109	30	140	22
			65	20	140	34

Στο *Χρωματογράφημα 3.3* παρατηρείται η αφθονία των ενώσεων σε ένα πρότυπο διάλυμα με τη βέλτιστη ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή και το βέλτιστο εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού.



Χρωματογράφημα 3.3 : Πρότυπο διάλυμα 250ppb μίγματος ABT, BT και MTBT με βέλτιστο εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού και ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή.

Το ΟΗΒΤ και το ΜΒΤ, όπως αναφέρουν οι Kloefer, Jekel και Reemtsma (2004), ανιχνεύονται στην αρνητική λειτουργία. Στην παρούσα εργασία όμως, σε αρνητικό ιοντισμό δεν παρατηρήθηκαν τα θυγατρικά ιόντα 107 και 42 για το ΟΗΒΤ. Εκτελώντας πλήρη σάρωση σε πρότυπο διάλυμα 500 ppb ΟΗΒΤ επιλέγονται τα ιόντα εκείνα τα οποία παρουσίαζαν την μεγαλύτερη αφθονία, δηλαδή τα πρόδρομα ιόντα m/z 121 και 42. Όμως, η ένταση της κορυφής για τα συγκεκριμένα πρόδρομα ιόντα ήταν και πάλι χαμηλή (Ένταση 10^3) συνεπώς απορρίπτεται ο αρνητικός ιοντισμός για το ΟΗΒΤ .

Στην παρούσα εργασία λοιπόν, επιλέγεται θετικός ιοντισμός για όλες τις ενώσεις. Το μοριακό και τα θυγατρικά ιόντα για το ΟΗΒΤ και ΜΒΤ καθώς και οι βέλτιστες συνθήκες της μεθόδου γι' αυτές τις ενώσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.9.

Πίνακας 3.9 : Μοριακά και θυγατρικά ιόντα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Βελτιστοποίηση ορισμένων παραμέτρων ώστε κάθε θυγατρικό ιόν να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αφθονία.

Ενώσεις	Ακρωνύμιο	Μοριακ ό ιόν	SRM	Ενέργεια πρόσκρουσης στην πηγή (source CID)	Εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού	Ενέργεια πρόσκρουσης
		(m/z)	Θυγατρικά ιόντα	(V)	(V)	(eV)
Θετικός ιοντισμός (M+H)⁺						
2-υδροξυβενζοθειαζόλιο	OHBT	152	124	20	100	12
			80	20	100	27
2-μερκαπτοβενζοθειαζόλιο	MBT	168	135	10	100	25
			124	10	100	20
6-καρβόξυλοβενζοθειαζόλιο	BTCA	180	109	20	120	30
			65	20	100	40

Η ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή και το εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού βελτιστοποιήθηκαν μεταβάλλοντας τα κάθε φορά όπως παραπάνω (*Παράρτημα I, Χρωματογραφήματα 1A-17 έως 1A-27*). Στον *Πίνακα 3.10* παρουσιάζεται η ένταση της κάθε κορυφής, μεταβάλλοντας κάθε φορά την ενέργεια πρόσκρουσης για τις ενώσεις του *Πίνακα 3.9*. Στη συνέχεια, μετά την εύρεση της βέλτιστης ενέργειας πρόσκρουσης για κάθε ένωση στο θετικό ιοντισμό, ελέγχεται το εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού (*Πίνακας 3.11*).

Πίνακας 3.10 : Έλεγχος σε πρότυπο διάλυμα 250 ppb για τη βελτιστοποίηση της ενέργειας πρόσκρουσης στη πηγή.

Ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή (eV)	OHBT		MBT	
	μοριακό ιόν m/z SRM	152 Θυγατρικά ιόντα	μοριακό ιόν m/z SRM	168 Θυγατρικά ιόντα
	124	80	135	124
	Ένταση κορυφής			
1	10100	28900	168000	64300
5	7200	24900	152000	52700
10	12500	35100	170000	64400
20	57500	40200	136000	67900
30	34500	20200	49600	24800
40	6230	4150	10400	5190

Πίνακας 3.11 : Έλεγχος σε πρότυπο διάλυμα 250 ppb για τη βελτιστοποίηση του εφαρμοζόμενου δυναμικού κυλινδρικού φακού.

Εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού (V)	OHBT		MBT	
	μοριακό ιόν m/z 152 SRM	μοριακό ιόν m/z 168 SRM	μοριακό ιόν m/z 152 SRM	μοριακό ιόν m/z 168 SRM
	124	80	135	124
αυτόματο	60300	40900	172000	67000
60	50200	37100	156000	56400
80	56600	40700	176000	68900
100	60500	41600	192000	75000
120	57900	39000	164000	63100

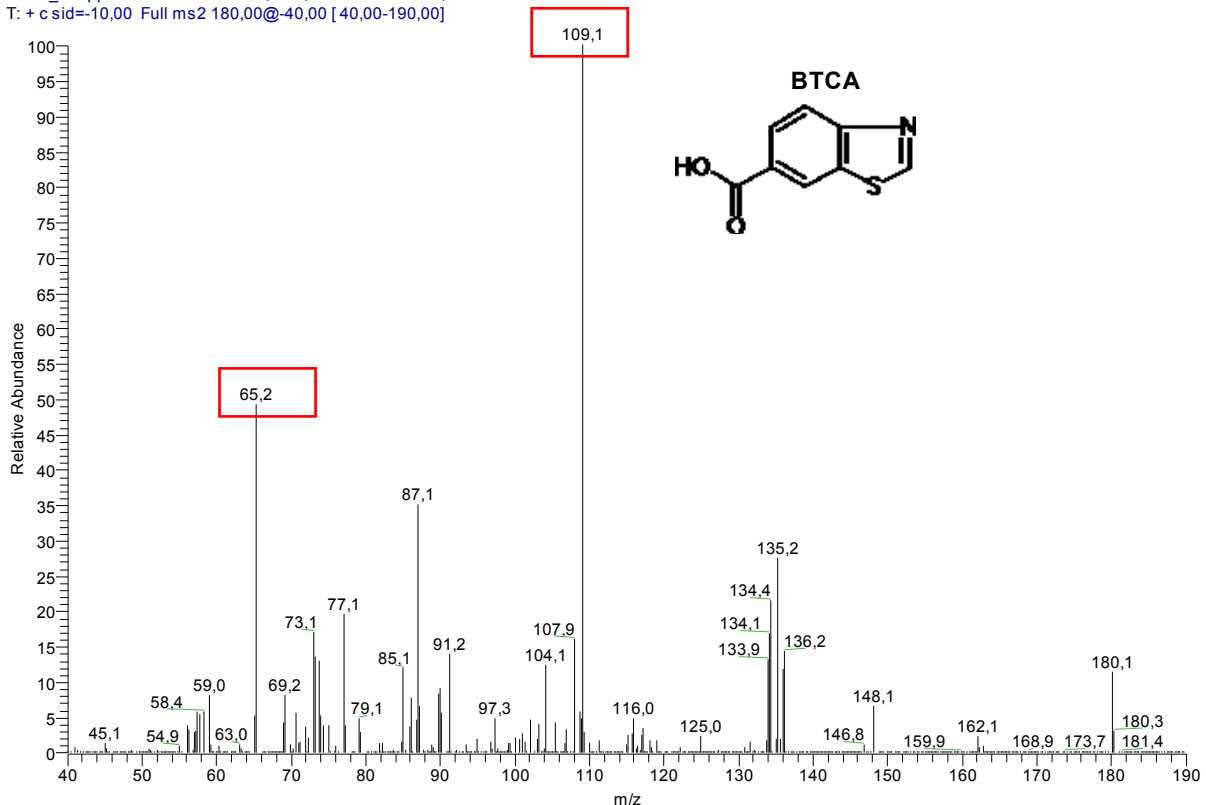
Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν πληροφορίες για το BTCA, το οποίο χρησιμοποιούν για εσωτερικό πρότυπο. Το εσωτερικό πρότυπο είναι μια ουσία που προστίθεται σε σταθερή ποσότητα σε όλα τα δείγματα, τα τυφλά και τα πρότυπα βαθμονόμησης κατά την ανάλυση (Skooq, 2002). Η επιλογή του BTCA γίνεται γιατί :

- Παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με τα βενζοθειαζόλια
- Ο χρόνος κατακράτησης του διαφέρει προς το χρόνο οποιασδήποτε άλλης ουσίας και στο χρωματογράφημα η κορυφή του εμφανίζεται πιο γρήγορα από τα προς προσδιορισμό βενζοθειαζόλια, αλλά συγχρόνως δεν απέχει πολύ από τις κορυφές των υπόλοιπων ενώσεων ούτως ώστε αφενός μεν δεν παρεμποδίζει τις υπόλοιπες κορυφές, αφετέρου διευκολύνει την ποσοτικοποίηση.

Βέβαια, για να χρησιμοποιηθεί μια ένωση σαν εσωτερικό πρότυπο θα πρέπει να μην υφίσταται στο περιβάλλον και συνεπώς και στα προς ανάλυση δείγματα. Στην παρούσα διατριβή αφού βελτιστοποιήθηκε η μέθοδος, έγινε έλεγχος εάν το BTCA υπάρχει σε δείγμα υγρών αποβλήτων και πράγματι υπήρχε, συνεπώς δεν χρησιμοποιείται στην εργασία αυτή ως εσωτερικό πρότυπο.

Για την επιλογή των κατάλληλων θραυσμάτων σε θετική λειτουργία του BTCA πραγματοποιείται πλήρης σάρωση και μεταβάλλεται η ενέργεια πρόσκρουσης στο τετράπολο από 5 έως 40 eV ώστε να καταγραφούν τα θραύσματα με τη μεγαλύτερη αφθονία (Χρωματογράφημα 3.4). Στη συνέχεια βελτιστοποιείται η ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή καθώς και το εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού όπως ακριβώς έγινε και για τις υπόλοιπες ενώσεις (Πίνακας 3.9).

BTCA_250ppb13 #247-261 RT: 4,19-4,43 AV: 15 NL: 4,37E3
T: + c sid=-10,00 Full ms2 180,00@-40,00 [40,00-190,00]



Χρωματογράφημα 3.4 : Παρουσίαση θυγατρικών ιόντων εκτελώντας πλήρης σάρωση προτύπου διαλύματος BTCA 250 ppb.

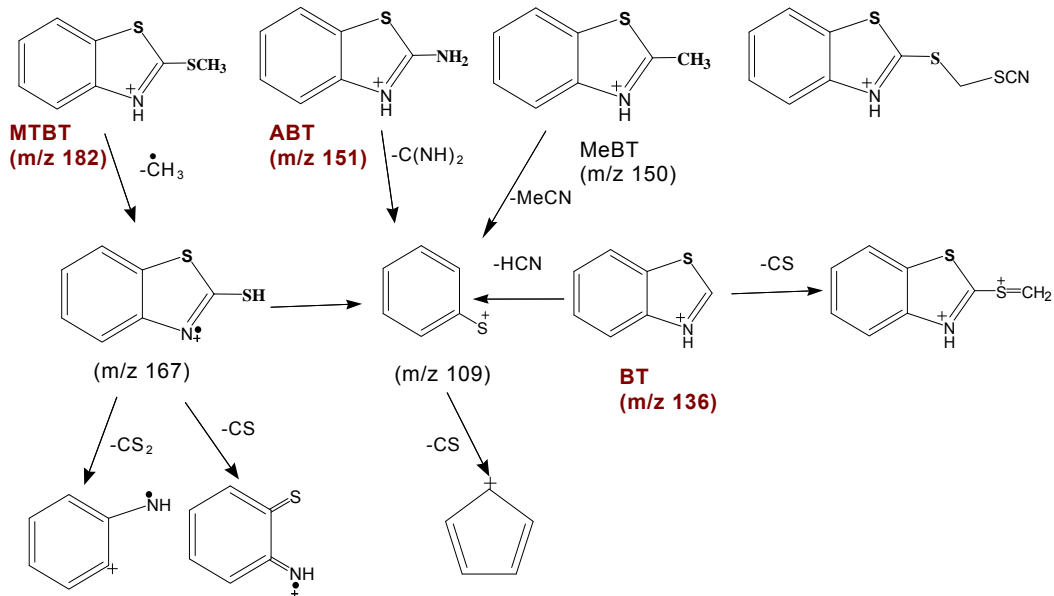
3.5 Μηχανισμοί θραυσματοποίησης των βενζοθειαζολίων

Για τα περισσότερα βενζοθειαζόλια δεν υπάρχουν στοιχεία για τους μηχανισμούς θραυσματοποίησής τους. Μόνο για το 2-θειοκυανομέθυλθειοβενζοθειαζόλιο (TCMTB) είναι μερικά στοιχεία διαθέσιμα.

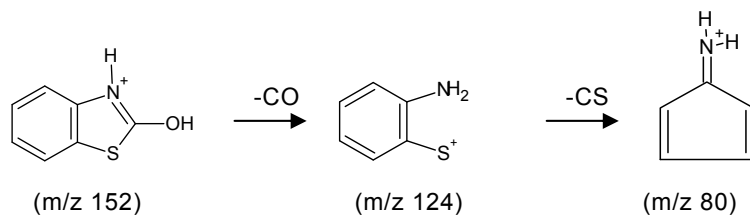
Οι σημαντικότερες θραυσματοποιήσεις των βενζοθειαζολίων που ερευνώνται σε αυτή την εργασία και που καθορίζονται από την ανίχνευση των πρόδρομων και θυγατρικών ιόντων παρουσιάζονται στα Σχήματα 3.2, 3.3, 3.4 και 3.5. . Εντούτοις, τα περισσότερα θραύσματα που διαμορφώνονται σε μια διαδοχική θραυσματοποίηση μπορούν επίσης να εμφανιστούν από την άμεση θραυσματοποίηση. Για παράδειγμα το MTBT με m/z 182 μπορεί να θραυσματοποιηθεί σε m/z 167 και σε m/z 109 (Σχήμα 3.2).

Στο Σχήμα 3.2 παρουσιάζονται οι μηχανισμοί θραυσματοποίησης των MTBT, ABT και BT. Για εκείνα τα βενζοθειαζόλια που στερούνται ένα άτομο θείου στη θέση 2, όπως το

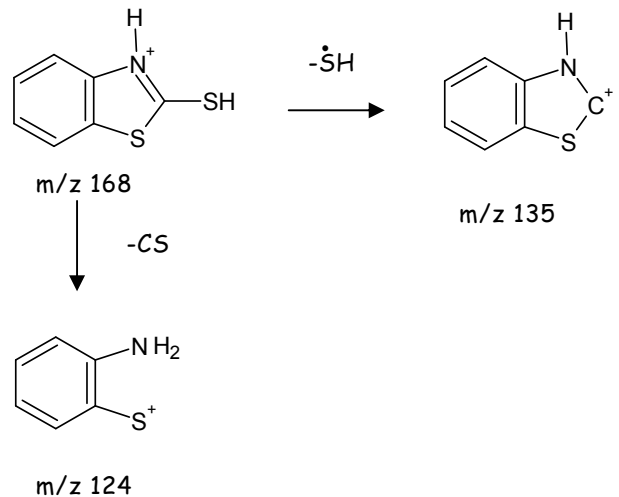
ABT και το BT, η διάσπαση του ετεροαρωματικού δακτυλίου εμφανίζεται και οδηγεί σε ιόντα με m/z 109 (Σχήμα 3.2) ως αρχικό θραύσμα με υψηλή ένταση. Σε υψηλότερες ενέργειες πρόσκρουσης, το κατιόν κυκλοπενταδιενυλίου (m/z 65) γίνεται το πιο χαρακτηριστικό για αυτές τις ενώσεις.



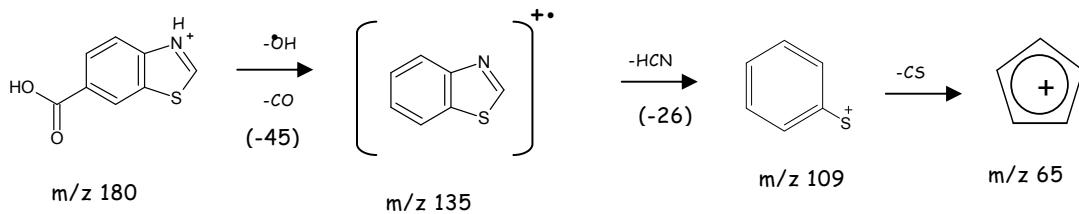
Σχήμα 3.2 : Μηχανισμοί θραυσματοποίησης των ABT, BT, MTBT (Reemtsma, 2000)



Σχήμα 3.3 : Προτεινόμενος μηχανισμός θραύσης του OHBT (m/z 152)



Σχήμα 3.4 : Προτεινόμενος μηχανισμός θραύσης του MBT (m/z 168)



Σχήμα 3.5 : Προτεινόμενος μηχανισμός θραύσης του BTCA (m/z 180)

3.6 Επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα της αναλυτικής διαδικασίας των βενζοθειαζολίων

Στην αναλυτική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν αναγκαίος ο έλεγχος της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας για τη διασφάλιση της ποιότητας των αποτελεσμάτων.

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 και λαμβάνονται με την ίδια ακριβώς αναλυτική μέθοδο την ίδια χρονική περίοδο.

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας ελήφθησαν δέκα συνεχόμενες (την ίδια μέρα) μετρήσεις ενός μίγματος βενζοθειαζολίων συγκέντρωσης 5 ppm. Στην συνέχεια έγινε υπολογισμός της τυπικής απόκλισης, και τα αποτελέσματα που προέκυψαν απεικονίζονται στον Πίνακα 3.12 που ακολουθεί. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Hypersil BDS C8 μήκους 25 cm, εσωτερικής διαμέτρου 4.0 mm, με υλικό πλήρωσης μεγέθους 5 μm, στους 45 °C.

Πίνακας 3.12 : Αποτελέσματα επαναληψιμότητας της μεθόδου

Αριθμός δειγμ.	Συγκέντρωση (ppm)	OHBT (area)	MBT (area)	BT (area)	ABT (area)	MTBT (area)
1	5	709,8	568,3	672,4	625,2	700,9
2	5	710,8	562,6	681,4	627,7	696,3
3	5	713,4	562,8	675,9	629,7	699,6
4	5	712,2	562,1	678,1	628,2	701,0
5	5	710,3	562,4	675,2	625,5	699,2
6	5	713,7	569,6	678,2	625,1	698,7
7	5	711,5	562,3	668,8	620,2	699,5
8	5	711,0	560,2	673,4	620,4	706,0
9	5	708,8	558,3	676,1	625,9	703,5
10	5	716,6	560,6	677,3	620,9	707,2
μέσος όρος		711,8	562,9	675,7	624,9	701,2
τυπική απόκλιση		2,3	3,5	3,5	3,4	3,4

Area : Επιφάνεια κορυφής

Η αναπαραγωγιμότητα (reproducibility) περιγράφει την μεταβλητότητα που παρουσιάζουν οι μετρήσεις, όταν το ίδιο δείγμα αναλυθεί σε διαφορετικές χρονικές περιόδους, χρησιμοποιώντας την ίδια αναλυτική μέθοδο.

Για τον έλεγχο της αναπαραγωγιμότητας ελήφθησαν 7 μετρήσεις ενός μίγματος βενζοθειαζολίων συγκέντρωσης 5 ppm στις ημερομηνίες που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.13. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Hypersil BDS C8 μήκους 25 cm, εσωτερικής διαμέτρου 4.0 mm, με υλικό πλήρωσης μεγέθους 5 μm, στους 45 °C και ταχύτητα ροής 1000 ml/min. Ο εισαγόμενος όγκος του δείγματος επιλέχθηκε στα 20 μl. Η έκλουση των συστατικών του δείγματος από την αναλυτική στήλη πραγματοποιείται ισοκρατικά, με αναλογία μεθανόλης υπερκάθαρου νερού 52/48 και 0,1% φορμικό οξύ. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν απεικονίζονται στον Πίνακα 3.13 .

Πίνακας 3.13 : Αποτελέσματα αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου

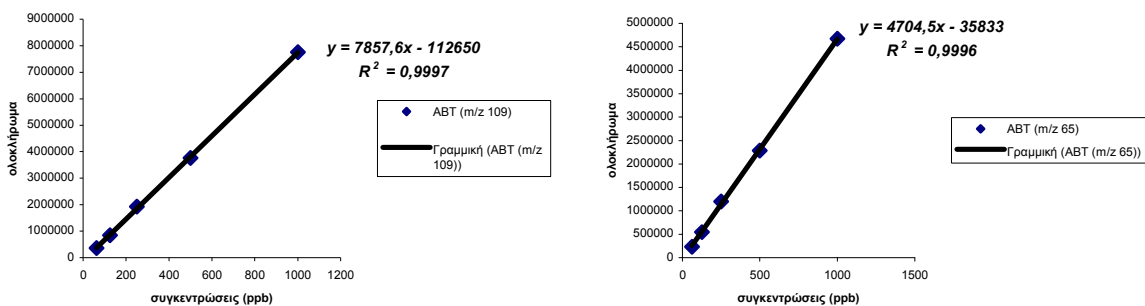
Ημερομηνία	Συγκέντρωση (ppm)	ABT (area)	OHBT (area)	BT (area)	MBT (area)	MTBT (area)
27/10/2005	5	540,7	607,5	802,5	510,1	596,6
29/10/2005	5	540,3	608,8	812,1	517,5	604,4
30/10/2005	5	535,8	609,2	811,3	520,0	602,6
31/10/2005	5	545,1	609,9	793,3	509,5	601,3
1/11/2005	5	538,9	614,3	803,8	508,7	603,1
2/11/2005	5	538,7	614,9	803,4	510,3	606,5
3/11/2005	5	540,0	620,1	801,7	514,3	610,1
μέσος όρος		539,9	612,1	804,0	512,9	603,5
τυπική απόκλιση		2,8	4,5	6,3	4,4	4,2

Μέτρο της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας αποτελεί η τυπική απόκλιση, η οποία όπως παρατηρείται από τους προηγούμενους πίνακες είναι μικρή για όλες τις ενώσεις. Μπορούμε λοιπόν να κάνουμε την παραδοχή ότι τα αποτελέσματα που λαμβάνουμε με χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου παρουσιάζουν επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα.

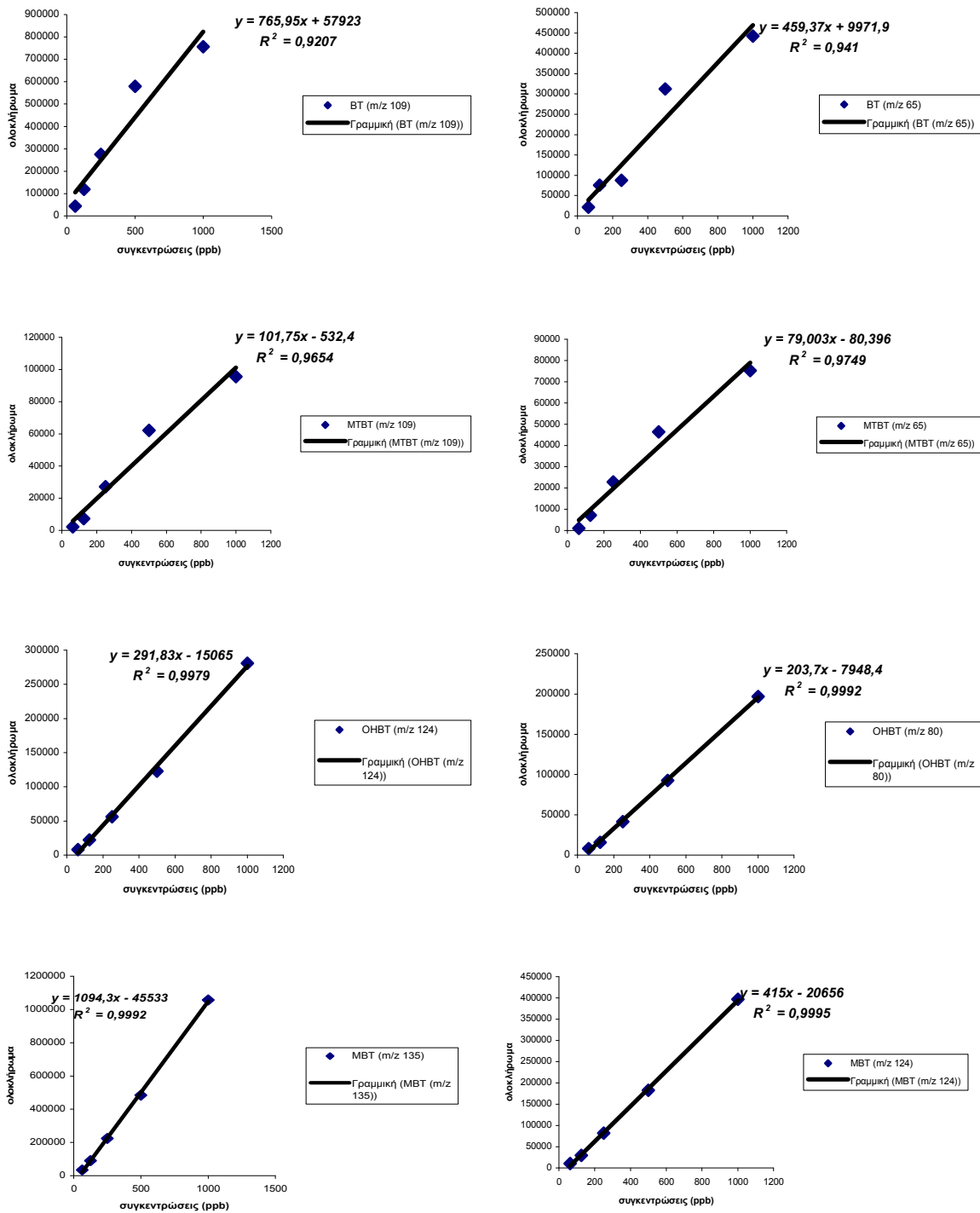
3.7 Ανάκτηση της μεθόδου

Για τον υπολογισμό της ανάκτησης της μεθόδου παρασκευάζονται τρία πρότυπα μίγματα βενζοθειαζολίων συγκέντρωσης 40ppb. Τα μίγματα φιλτράρονται και ακολουθεί εκχύλιση στερεάς φάσης όπως ακριβώς περιγράφεται στις Παραγράφους 2.3 και 2.4 του Κεφαλαίου 2. Γνωρίζοντας την αρχική συγκέντρωση του μίγματος μπορεί να υπολογιστεί η ανάκτηση της μεθόδου, η οποία θα λαμβάνεται υπόψη σε κάθε πραγματικό δείγμα υγρής φάσης. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε τρεις φορές ώστε τα αποτελέσματα να είναι αξιόπιστα.

Αρχικά, παρασκευάζεται μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε θραύσμα κάθε βενζοθειαζολίου και στη συνέχεια από την εξίσωση κάθε καμπύλης υπολογίζεται η τελική συγκέντρωση των μιγμάτων. Οι καμπύλες βαθμονόμησης παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.6α και 3.6β, όπου αναφέρονται και οι εξισώσεις των καμπυλών ύστερα από τη χρήση των ελάχιστων τετραγώνων, ώστε να είναι δυνατός ο άμεσος υπολογισμός των συγκεντρώσεων των δειγμάτων.



Σχήμα 3.6α : Καμπύλες βαθμονόμησης για τον υπολογισμό της ανάκτησης της μεθόδου για το ABT.



Σχήμα 3.6β : Καμπύλες βαθμονόμησης για τον υπολογισμό της ανάκτησης της μεθόδου

Πριν την εκχύλιση στερεάς φάσης η συγκέντρωση κάθε προτύπου διαλύματος ήταν 40ppb και ο όγκος 250ml. Ακολουθεί συμπύκνωση μέσω της διαδικασίας εκχύλισης, 125φορές αφού ο τελικός όγκος είναι 2 ml. Αν η ανάκτηση της μεθόδου είναι 100% τότε θα αναμενόταν η τελική συγκέντρωση να είναι 5 ppb.

Η τελική συγκέντρωση των μιγμάτων, mixA_3 - mixB_3 - mixC_3 , υπολογίζεται από τις εξισώσεις (σχήμα 3.6) και εν συνεχεία γίνεται ο υπολογισμός της ανάκτησης από τη σχέση :

$$\% \text{ Ανάκτηση} = \frac{100 \cdot \text{τελική συγκέντρωση μίγματος (ppb)}}{5000 \text{ (ppb)}}$$

Τα αποτελέσματα από τους παραπάνω υπολογισμούς παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.14.

Πίνακας 3.14 : Ανάκτηση θυγατρικών ιόντων κάθε ένωσης, μέσος όρος, τυπική απόκλιση.

μετά από SPE	ABT		BT		MTBT		OHBT		MBT	
	m/z μητρικό ιόν 151		m/z μητρικό ιόν 136		m/z μητρικό ιόν 182		m/z μητρικό ιόν 152		m/z μητρικό ιόν 168	
	Θυγατρικά ιόντα (SRM)		Θυγατρικά ιόντα (SRM)		Θυγατρικά ιόντα (SRM)		Θυγατρικά ιόντα (SRM)		Θυγατρικά ιόντα (SRM)	
	109	65	109	65	109	65	124	80	135	124
ποσοστό (%)										
mixA3	100,40	96,35	90,69	89,73	124,57	118,32	101,01	97,56	0,60	0,81
mixB3	116,91	112,31	120,08	126,11	140,16	130,21	126,98	129,26	1,60	1,71
mixC3	115,69	111,93	111,83	102,55	128,64	129,86	124,84	127,42	2,12	2,41
μέσος όρος	111,00	106,86	107,54	106,13	131,13	126,13	117,61	118,08	1,44	1,64
τυπική απόκλιση	9,20	9,11	15,16	18,45	8,09	6,77	14,41	17,79	0,77	0,81

Οι ανακτήσεις όλων των ενώσεων που μας ενδιαφέρουν στη διαλυτή φάση, εκτός από το MBT, είναι 100%, όπως παρατηρείται στον Πίνακα 3.14. Αντίθετα, η ανάκτηση του MBT για κάποιο λόγο είναι σχεδόν μηδενική.

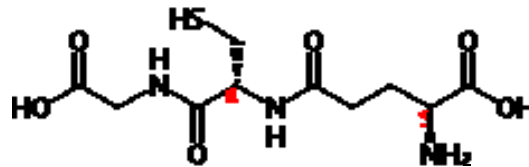
Αυτό συμβαίνει γιατί το MBT κατά τη διάρκεια της εκχύλισης στερεάς φάσης οξειδώνεται. Όσο περισσότερο χρόνο χρειάζεται το δείγμα να εκχυλιστεί τόσο περισσότερο οξειδώνεται το MBT (Kloepfer, 2004).

Το MBT περιέχει μια ομάδα θείου και οξειδώνεται στο MBTS (δι-(2-βενζοθειαζολυλο)-δισουλφίδιο) όπως ακριβώς παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.7 (Kloepfer, 2005). Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) το MBT οξειδώνεται πιθανόν λόγω του υψηλού τομέα επιφάνειας της στερεάς φάσης που είναι ευνοϊκός για τις αντιδράσεις οξειδωσης. Το υποθετικό προϊόν οξειδωσης MBTS είναι δύσκολο να ανιχνευθεί και να ποσοτικοποιηθεί χρησιμοποιώντας ESI-MS. Επιπλέον, είναι αρκετά υδρόφοβο και δεν έχει ανιχνευθεί ποτέ σε υδάτινα περιβαλλοντικά δείγματα (Kloepfer, 2004). Επομένως, δεν περιλήφθηκε σε αυτήν την αναλυτική μέθοδο.



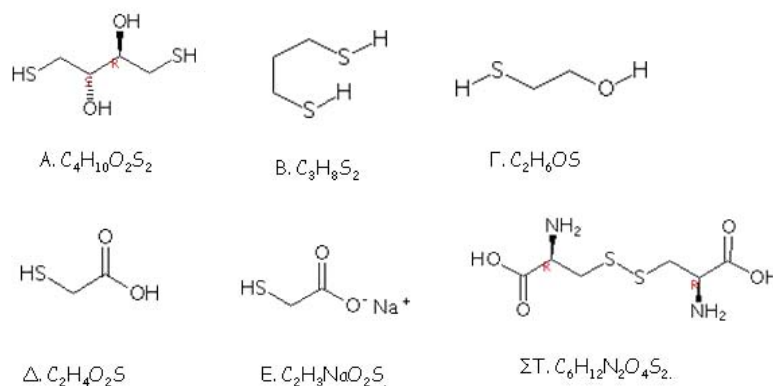
Σχήμα 3.7 : Οξειδωση του MBT σε MBTS.

Για να προστατευθεί το MBT από την οξειδωση χρησιμοποιείται η γλουταθειόνη (GSH) η δομή της οποίας φαίνεται στο Σχήμα 3.8. Η γλουταθειόνη, στην ανηγμένη της μορφή προστατεύει το MBT, αφού οξειδώνεται αυτή στη θέση της.



Σχήμα 3.8 : Δομή γλουταθειόνης

Σε άλλες μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλα αναγωγικά αντιδραστήρια (Σχήμα 3.9) όμως από όλα όσα έχουν εξετασθεί η γλουταθειόνη είναι η καταλληλότερη αφού τα άλλα παρουσίαζαν είτε υψηλές συγκεντρώσεις τυφλού είτε φτωχές ιδιότητες προστασίας (Kloepfer, 2004).



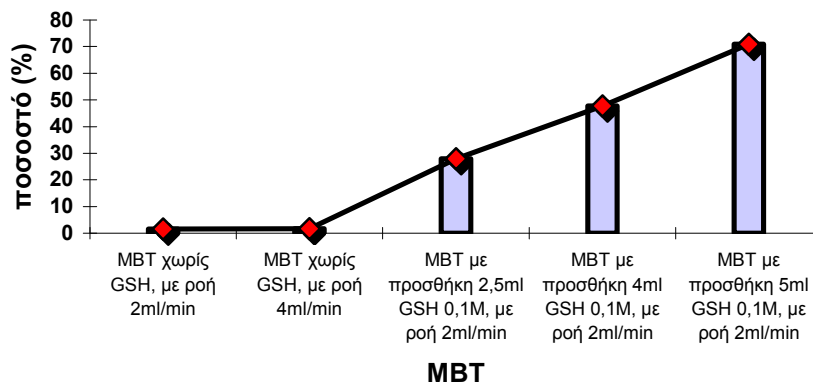
Σχήμα 3.9 : Αναγωγικά αντιδραστήρια που έχουν χρησιμοποιηθεί για την αποφυγή οξειδωσης του MBT

Σύμφωνα με τα παραπάνω, όσο περισσότερο χρόνο παραμένει το MBT πάνω στη μικροστήλη τόσο περισσότερο οξειδώνεται. Γι' αυτό το λόγο ελέγχεται η ανάκτηση των ενώσεων χρησιμοποιώντας διαφορετική ροή στη διάταξη πολλών μικροστηλών.

Επιλέγεται ροή 2 ml/min και 4 ml/min. Παρατηρείται ότι η ανάκτηση του MBT δεν έχει σημαντική διαφορά μεταβάλλοντας τη ροή (Παράρτημα I, Πίνακας 1B-1 και Σχήμα 3.10).

Έτσι λοιπόν, χρησιμοποιείται γλουταθειόνη πριν φιλτραριστεί το πρότυπο διάλυμα. Αρχικά, προστίθεται 2,5 ml GSH 0,1 M και επαναλαμβάνεται το πείραμα 3 φορές. Παρατηρείται σημαντική βελτίωση της ανάκτησης του MBT από περίπου 1,5% όταν δεν είχε χρησιμοποιηθεί γλουταθειόνη στα 27% (Σχήμα 3.10) με τη χρήση γλουταθειόνης.

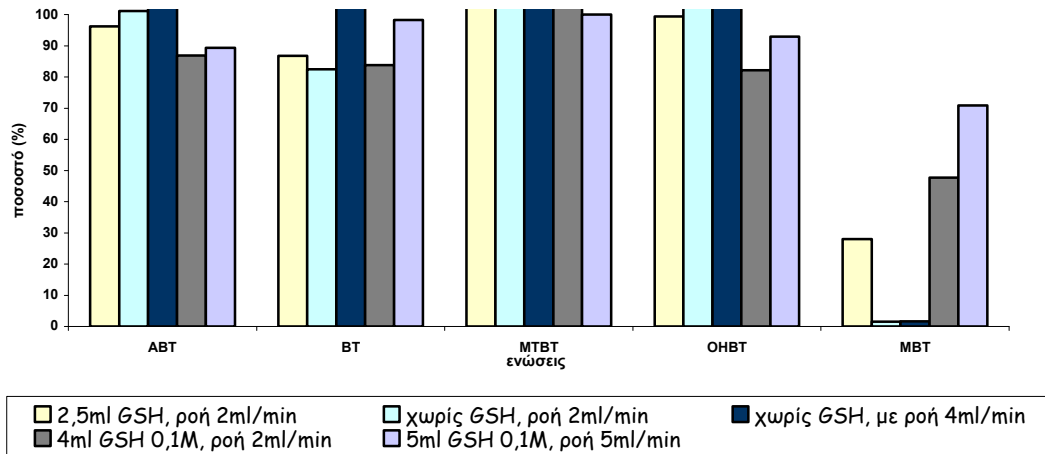
Στη συνέχεια, ακολουθείται πάλι η ίδια διαδικασία προσθέτοντας κάθε φορά διαφορετική ποσότητα GSH ώστε να βελτιστοποιηθεί η ανάκτηση του MBT. Με την προσθήκη 5ml GSH η ανάκτηση του MBT είναι περίπου 71%(Σχήμα 3.10).



Σχήμα 3.10 : Μεταβολή της ανάκτησης του MBT με προσθήκη GSH.

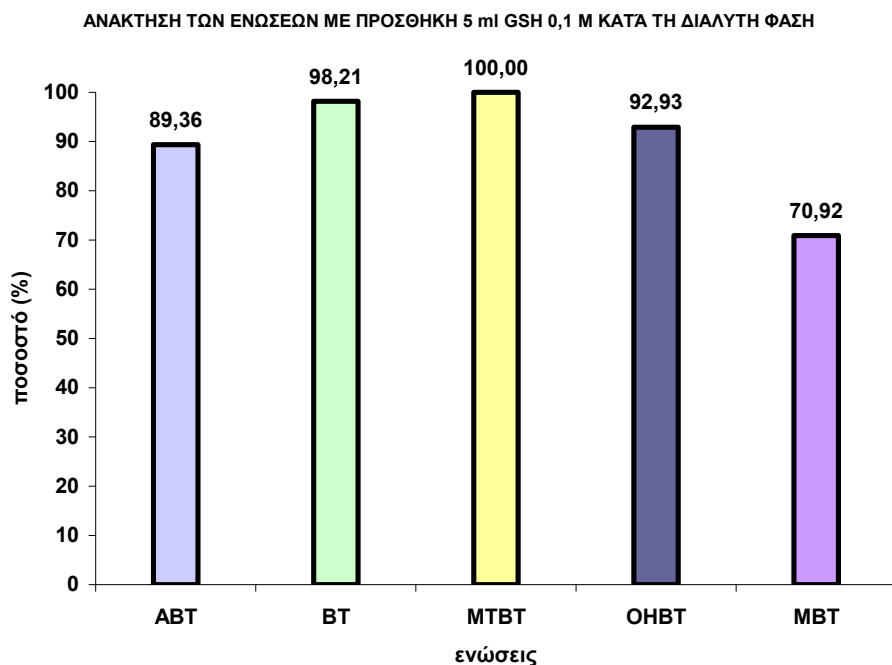
Στο Σχήμα 3.11 παρουσιάζονται οι ανακτήσεις στη διαλυτή φάση όλων των ενώσεων, χωρίς προσθήκη GSH 0,1 M με διαφορετική ροή κάθε φορά και με προσθήκη 2,5ml, 4 ml και 5 ml GSH 0,1 M.

Ελέγχοντας τις ανακτήσεις των ABT, BT, MTBT και OHBT στη διαλυτή φάση παρατηρείται ότι οι ανακτήσεις του BT μεταβάλλονται αισθητά ακόμα και κατά την επανάληψη του ίδιου ακριβώς πειράματος (Παράρτημα I, Πίνακας 1B-1). Αυτό συμβαίνει γιατί υπάρχει απώλεια του BT κατά την εξάτμιση με ρεύμα αερίου N₂, δεδομένου ότι αυτό είναι μια από τα λιγότερο πολικά και πιο πτητικά βενζοθειαζόλια (Kloepfer, 2004).



Σχήμα 3.11 : Ανάκτηση των βενζοθειαζολίων χωρίς προσθήκη GSH και ροή 2 ml και 4 ml στη διάταξη πολλών μικροστηλών και με προσθήκη GSH 2,5 ml, 4 ml και 5 ml 0,1 M.

Συμπερασματικά, η ανάκτηση της μεθόδου για τη διαλυτή φάση υπολογίζεται προσθέτοντας πριν τη διήθηση στα πρότυπα μίγματα βενζοθειαζολίων 5 ml GSH 0,1 M. Τότε, η ανάκτηση των κάθε βενζοθειαζολίων που ερευνάται στην παρούσα διατριβή, θα είναι αυτή που παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.12.

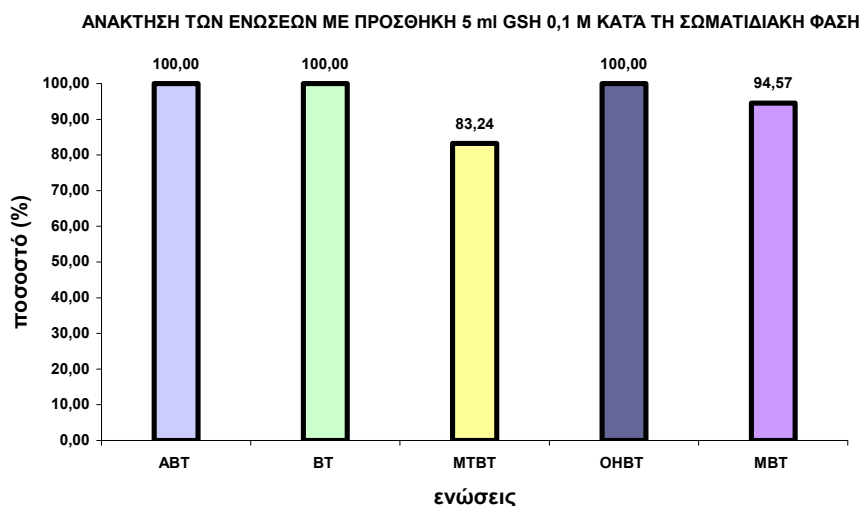


Σχήμα 3.12 : Ανάκτηση των βενζοθειαζολίων με προσθήκη 5 ml GSH 0,1 M στη διαλυτή φάση.

Στην παρούσα διατριβή τα στερεά σωματίδια, όπως αναφέρεται στο Κεφάλαιο 2 Παράγραφος 2.3, συλλέγονται κατά τη διάρκεια της διήθησης της διαλυτής φάσης και ακολουθεί συνεχής εκχύλιση (Soxhlet). Έπειτα, ακολουθείται η ίδια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στη διαλυτή φάση.

Εύλογο λοιπόν είναι, αφού αλλάζει η μέθοδος να υπολογιστεί μία νέα ανάκτηση για τα σωματίδια. Στα τρία διαφορετικά είδη φίλτρων που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία γίνεται προσθήκη μερικών σταγόνων μίγματος (500 μl) βενζοθειαζολίων συγκέντρωσης 80 ppb. Τα φίλτρα τοποθετούνται στη συσκευή Soxhlet και εισάγονται 200 ml μεθανόλης. Πραγματοποιείται συνεχής εκχύλιση για 24 ώρες, ο διαλύτης εξατμίζεται στο ρότορα σχεδόν μέχρι ξηρού, προστίθονται 5 ml GSH 0,1 M και υπερκάθαρο νερό έως τα 250 ml. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται εκχύλιση στερεάς φάσης και το δείγμα οδηγείται στην HPLC-ESI-MS. Η διαδικασία αυτή ακολουθείται 3 φορές, ώστε να ερευνηθεί εκτός από τα ποσοστά ανάκτησης κάθε ένωσης και η επαναληψιμότητά της (Παράρτημα I, Πίνακας 1B-2).

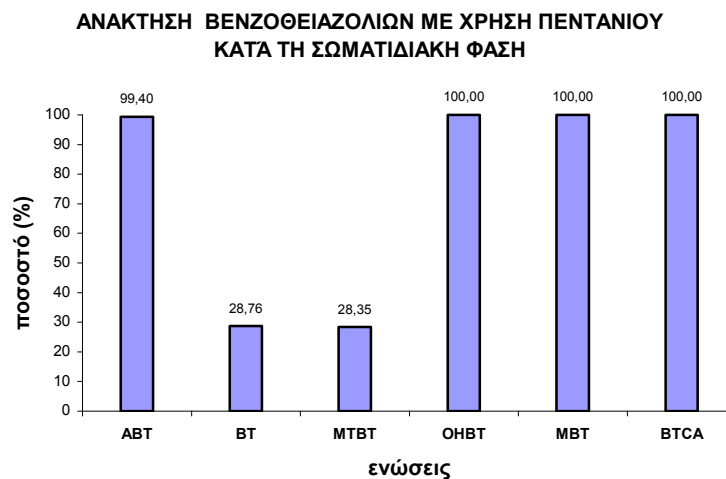
Αφού παρασκευάστηκαν οι καμπύλες βαθμονόμησης για κάθε θραύσμα κάθε βενζοθειαζολίου και υπολογίστηκε από την εξίσωση κάθε καμπύλης η τελική συγκέντρωση των μιγμάτων, βρέθηκε η ανάκτηση κάθε ένωσης στη σωματιδιακή φάση και παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.13. Οι ανακτήσεις αυτές θα χρησιμοποιηθούν για την ποσοτικοποίηση βενζοθειαζολίων σε πραγματικά δείγματα για τη σωματιδιακή φάση.



Σχήμα 3.13 : Ανάκτηση των βενζοθειαζολίων με 5 ml GSH 0,1 M στη σωματιδιακή φάση.

Όμως, κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας κάποιων δειγμάτων εισροής του βιολογικού καθαρισμού στη σωματιδιακή φάση, τα δείγματα ήταν θολά με αισθητή την παρουσία λιπιδίων. Πριν την ανάλυση στο όργανο HPLC-ES-MS/MS θεωρήθηκε απαραίτητο η απομάκρυνση αυτών, ώστε να μη δημιουργηθεί πρόβλημα τόσο στη στήλη όσο και στον ηλεκτροψεκασμό. Στα συγκεκριμένα, λοιπόν, δείγματα έγινε προσθήκη πεντανίου θεωρώντας πως δεν είναι ικανό να δεσμεύσει τις προς ανάλυση ενώσεις.

Συνεπώς, εξετάστηκε, ελέγχοντας την ανάκτηση με χρήση πεντανίου, αν τελικά το πεντάνιο είναι κατάλληλο για την απομάκρυνση των λιπιδίων χωρίς βέβαια να απομακρύνονται και τα βενζοθειαζολία από το δείγμα (Σχήμα 3.14).



Σχήμα 3.14 : Ανάκτηση των βενζοθειαζολίων στη σωματιδιακή φάση με χρήση πεντανίου και 5 ml GSH 0,1 M.

Παρατηρείται λοιπόν, πως το μεγαλύτερο ποσοστό του BT και του MTBT δεσμεύεται από το πεντάνιο αφού η ανάκτηση των ενώσεων αυτών ήταν 28,76% και 28,35% αντίστοιχα. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και με εξάνιο και κυκλοεξάνιο και τα ποσοστά ανάκτησης ήταν ακόμη χαμηλότερα για το BT και το MTBT.

Τελικά, χρησιμοποιείται το πεντάνιο σε δείγματα που παρουσίαζαν λίπη μετά την επεξεργασία τους (εισροή σωματιδιακής φάσης), αφού δεν βρέθηκε καταλληλότερη μέθοδος για αυτά.

3.8 Όριο ανίχνευσης του φασματογράφου μάζας

Σαν όριο ανίχνευσης μίας μεθόδου ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση ή ποσότητα του αναλύτη η οποία μπορεί να παράγει σήμα μέτρησης ικανό να διακριθεί από τον θόρυβο υποβάθρου, ή να ανιχνευτεί, με κάποιο καθορισμένο όριο (στάθμη) εμπιστοσύνης. Είναι γενικά αποδεκτό ότι ένα τέτοιο σήμα θα πρέπει να είναι ίσο με το άθροισμα του μέσου όρου του σήματος ενός συγκεκριμένου αριθμού μετρήσεων του τυφλού διαλύματος και του πολλαπλάσιου (*k) της τυπικής απόκλισης του μέσου όρου των μετρήσεων του τυφλού διαλύματος. Σαν μία λογική τιμή για την σταθερά k έχει προταθεί η τιμή 3, στην οποία η στάθμη εμπιστοσύνης για την ανίχνευση είναι 95% στις περισσότερες περιπτώσεις. Επομένως το σήμα μέτρησης που αντιστοιχεί στο όριο ανίχνευσης, δηλαδή στην ελάχιστη συγκέντρωση ή ποσότητα του αναλύτη που μπορεί να μετρηθεί με στάθμη εμπιστοσύνης 95%, θα πρέπει να διαφέρει από το σήμα του τυφλού κατά το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης του μέσου όρου των μετρήσεων του τυφλού, (Skoog, 2002).

Στην παρούσα διατριβή ο υπολογισμός του ορίου ανίχνευσης του οργάνου, γίνεται με την χρήση των παρακάτω σχέσεων (Geib, 2001) :

$$I = blank + 3SD$$

$$IDL = I \cdot \frac{C_{Std}}{I_{Std}}$$

όπου:

blank= ολοκλήρωμα του τυφλού (υπερκάθαρο νερό)

SD= τυπική απόκλιση των ολοκληρωμάτων των τριών τυφλών

Cstd= συγκέντρωση προτύπου διαλύματος= 50ppb

I_{std}= ολοκλήρωμα του προτύπου διαλύματος

IDL= όριο ανίχνευσης του οργάνου

Ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης, γίνεται βάσει των παραπάνω σχέσεων αφού μετρηθούν 10 διαλύματα τυφλών (περιέχουν μόνο υπερκάθαρο νερό), και υπολογιστεί η επιφάνεια που αντιστοιχεί στον χρόνο που αναμένεται να εμφανιστούν οι ενώσεις.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την επεξεργασία των δεδομένων και τη χρήση των παραπάνω εξισώσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.15.

Πίνακας 3.15 : Όρια ανίχνευσης θραυσμάτων κάθε ένωσης που εξετάζεται.

	ABT		BT		MTBT		OHBT		MBT		BTCA	
	m/z μητρικό ιόν 151		m/z μητρικό ιόν 136		m/z μητρικό ιόν 182		m/z μητρικό ιόν 152		m/z μητρικό ιόν 168		m/z μητρικό ιόν 180	
	Θυγατρικά ιόντα (SRM)		Θυγατρικά ιόντα (SRM)		Θυγατρικά ιόντα (SRM)		Θυγατρικά ιόντα (SRM)		Θυγατρικά ιόντα (SRM)		Θυγατρικά ιόντα (SRM)	
	109	65	109	65	109	65	124	80	135	124	109	65
blank01	55,82	4085	2564	3032	0	226	0	10,61	110	0	8,31	367
blank02	95,61	398	263	2275	19,49	60,86	342	13,46	65,43	12,56	7,08	30,3
blank03	126,34	720	55,81	400	1,19	352	162	201	0	246	7,91	117
blank04	201	4498	194	1253	18,67	139	0	179	101	11,45	5,05	45,22
blank05	19,42	316	952	3140	44,78	50,87	368	63,16	19,4	14,35	21,02	13,91
blank06	6,6	603	183	1316	10,61	32,88	432	44,27	0	9,84	10,36	0
blank07	221	383	1748	996	28,21	145	17,96	42,3	34,98	14,44	42,06	56,85
blank08	1601	611	435	299	20,63	62,16	243	237	3,03	30,04	11,5	0
blank09	77,3	605	993	504	10,86	46,88	142	10,9	67,49	0	22,52	21,98
blank10	161	1397	1642	1839	28,63	10,01	177	9,75	52,59	217	94,82	13,02
(ppb)	Ολοκλήρωμα επιφάνειας κορυφής											
50	1638536	859567	146465	90674	7717	3398	23260	9169	25713	3167	64552	17991
LOD												
τυπική απόκλιση	477,84	1576,13	843,08	1040,58	13,56	106,54	156,77	88,83	40,70	93,35	27,56	104,34
μέσος όρος	256,51	1361,60	902,98	1505,40	18,31	112,57	188,40	81,15	45,39	55,57	23,06	84,62
I=blank+3 SD	1690,04	6089,98	3432,21	4627,13	58,99	432,17	658,70	347,63	167,49	335,62	105,75	397,64
I*(Csd/Isd)	0,05	0,35	1,17	2,55	0,38	6,36	1,42	1,90	0,33	5,30	0,08	1,11

Βέβαια, λέγοντας όριο ανίχνευσης νοείται το όριο ανίχνευσης της ένωσης και όχι του κάθε θραύσματος χωριστά. Συνεπώς, επιλέγεται η πιο χαμηλή τιμή του IDL για κάθε ένωση και αναγράφεται στον Πίνακα 3.16 που ακολουθεί.

Πίνακας 3.16 : Όρια ανίχνευσης βενζοθειαζολίων.

Όριο ανίχνευσης οργάνου	
IDL (µg/L)	
ABT	0,05
BT	1,17
MTBT	0,38
OHBT	1,42
MBT	0,33
BTCA	0,08

3.9 Όριο ανίχνευσης της μεθόδου (MDL)

Ο υπολογισμός του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου (Method Detection Limit, MDL) γίνεται λαμβάνοντας υπόψη το IDL καθώς, το επί τοις εκατό ποσοστό ανάκτησης της μεθόδου και τέλος τον βαθμό στον οποίο έγινε συμπύκνωση του δείγματος. Στη συγκεκριμένη περίπτωση γίνεται συμπύκνωση του διαλύματος 250 φορές αφού από 500 mL όγκου αρχικά, καταλήγουμε σε 2 mL ύστερα από την εκχύλιση στερεάς φάσης:

$$MDL = \frac{IDL \cdot \frac{100}{\text{ανάκτηση}}}{\text{συμπύκνωση}}$$

Λαμβάνοντας λοιπόν τα παραπάνω, το όριο ανίχνευσης της μεθόδου κάθε ένωσης παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.17:

Πίνακας 3.17 : Όρια ανίχνευσης της μεθόδου (MDL) για κάθε ένωση.

Όριο ανίχνευσης της μεθόδου	
MDL (μg/L)	
ABT	1,7 10 ⁻³
BT	4,8 10 ⁻³
MTBT	1,5 10 ⁻³
OHBT	6,4 10 ⁻³
MBT	1,9 10 ⁻³
BTCA	3,3 10 ⁻⁴

3.10 Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)

Η μικρότερη συγκέντρωση στην οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί ποσοτική μέτρηση ονομάζεται όριο ποσοτικοποίησης (limit of quantification). Το κατώτερο όριο ποσοτικών μετρήσεων γενικά θεωρείται ότι είναι δεκαπλάσιο της τυπικής απόκλισης του τυφλού (Skooq, 2002).

Στην παρούσα διατριβή ο υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης, γίνεται με την χρήση των παρακάτω σχέσεων (Geib, 2001) :

$$I = \text{blank} + 10SD$$

$$LOQ = I \cdot \frac{C_{Std}}{I_{Std}}$$

όπου:

blank= ολοκλήρωμα του τυφλού (υπερκάθαρο νερό)

SD= τυπική απόκλιση των ολοκληρωμάτων των τριών τυφλών

Cstd= συγκέντρωση προτύπου διαλύματος= 50ppb

I_{std}= ολοκλήρωμα του προτύπου διαλύματος

LOQ= όριο ποσοτικοποίησης

Ο προσδιορισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ), γίνεται βάσει των παραπάνω σχέσεων αφού μετρηθούν 10 διαλύματα και υπολογιστεί η επιφάνεια που αντιστοιχεί στον χρόνο που αναμένεται να εμφανιστούν οι ενώσεις.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την επεξεργασία των δεδομένων και τη χρήση των παραπάνω σχέσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.18.

Πίνακας 3.18 : Όρια ποσοτικοποίησης θραυσμάτων κάθε βενζοθειαζολίου.

	ABT		BT		MTBT		OHBT		MBT		BTCA	
	m/z μητρικό ιόν 151		m/z μητρικό ιόν 136		m/z μητρικό ιόν 182		m/z μητρικό ιόν 152		m/z μητρικό ιόν 168		m/z μητρικό ιόν 180	
	Θυγατρικά ιόντα (SRM)		Θυγατρικά ιόντα (SRM)		Θυγατρικά ιόντα (SRM)		Θυγατρικά ιόντα (SRM)		Θυγατρικά ιόντα (SRM)		Θυγατρικά ιόντα (SRM)	
	109	65	109	65	109	65	124	80	135	124	109	65
blank01	55,82	4085	2564	3032	0	226	0	10,61	110	0	8,31	367
blank02	95,61	398	263	2275	19,49	60,86	342	13,46	65,43	12,56	7,08	30,3
blank03	126,34	720	55,81	400	1,19	352	162	201	0	246	7,91	117
blank04	201	4498	194	1253	18,67	139	0	179	101	11,45	5,05	61,61
blank05	19,42	316	952	3140	44,78	50,87	368	63,16	19,4	14,35	21,02	31,8
blank06	6,6	603	183	1316	10,61	32,88	432	44,27	0	9,84	10,36	92,75
blank07	221	383	1748	996	28,21	145	17,96	42,3	34,98	14,44	42,06	66,69
blank08	1601	611	435	299	20,63	62,16	243	237	3,03	30,04	11,5	30,06
blank09	77,3	605	993	504	10,86	46,88	142	10,9	67,49	0	22,52	11,72
blank10	161	1397	1642	1839	28,63	10,01	177	9,75	52,59	217	94,82	37,24
Συγκέντρωση (ppb)	Ολοκλήρωμα επιφάνειας κορυφής											
50	2E+06	859567	146465	90674	7717	3398	23260	9169	25713	3167	64552	17991
LOQ												
SD	477,84	1576,13	843,08	1040,58	13,56	106,54	156,77	88,83	40,70	93,35	27,56	104,34
average	256,51	1361,60	902,98	1505,40	18,31	112,57	188,40	81,15	45,39	55,57	23,06	84,62
I=blank+10SD	5034,94	17122,87	9333,75	11911,16	153,92	1177,93	1756,09	969,41	452,38	989,08	298,68	1128,01
LOQ=I*(Csd/lstd)	0,15	1,00	3,19	6,57	1,00	17,33	3,77	5,29	0,88	15,62	0,23	3,13

Επιλέγεται η πιο χαμηλή τιμή του LOQ για κάθε ένωση και τελικά το όριο ποσοτικοποίησης για κάθε βενζοθειαζόλιο παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.19 που ακολουθεί.

Πίνακας 3.19 : Όρια ποσοτικοποίησης για κάθε ένωση.

	Όριο ποσοτικοποίησης LOQ (μg/L)
ABT	0,15
BT	3,19
MTBT	1,00
OHBT	3,77
MBT	0,88
BTCA	0,23

ΚΕΦ 4. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΕΝΖΟΘΕΙΑΖΟΛΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟΡΡΟΗΣ ΔΡΟΜΟΥ, ΣΕ ΛΑΣΤΙΧΑ ΑΥΤΟΚΙΝΗΤΟΥ ΚΑΙ ΣΕ ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός βενζοθειαζολίων σε δείγματα απορροής δρόμου

Στις 18/10/06 και 04/01/07 συλλέχθηκαν δείγματα κατά τη διάρκεια βροχόπτωσης σε ασφαλτοστρωμένο κεντρικό δρόμο της Χερσονήσου, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βενζοθειαζολίων. Στα δείγματα προστέθηκε γλουταθειόνη (GSH) για την αποφυγή της οξειδωσης του MBT και εν συνεχεία έγινε διήθηση ώστε να διαχωριστεί η διαλυτή από τη σωματιδιακή φάση. Ακολούθησε συνεχής εκχύλιση των φίλτρων και εκχύλιση στερεάς φάσης, όπως ακριβώς παρουσιάστηκαν στο Κεφάλαιο 2, στις Παραγράφους 2.4 και 2.5.

Στο δείγμα απορροής 18/10/06 ελέγχθηκε μόνο η διαλυτή φάση, ενώ στο δείγμα απορροής 4/01/07 ελέγχθηκε τόσο η διαλυτή όσο και η σωματιδιακή φάση.

Στον Πίνακα 4.1 και 4.2 παρατίθενται τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των βενζοθειαζολίων για τα δύο αυτά δείγματα καθώς και η επί τοις εκατό κατανομή τους.

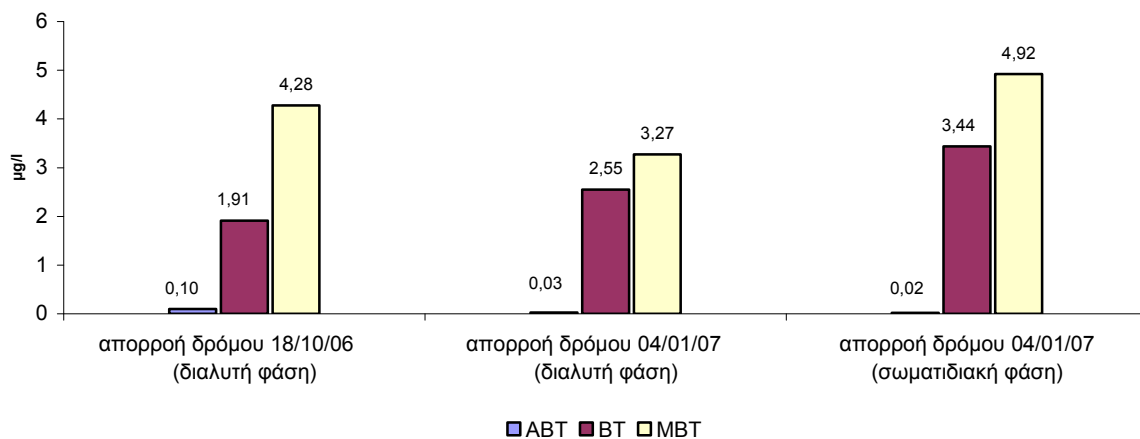
Πίνακας 4.1 : Ποσοτικοποίηση βενζοθειαζολίων σε δείγμα απορροής δρόμου στη διαλυτή φάση (δειγματοληψία 18/10/06)

Διαλυτή φάση (δείγμα απορροής 18/10/06)		
Ενώσεις	μg/L	Ποσοστό (%)
ABT	0,10	1,55
BT	1,91	30,40
MTBT	Δ.Α	
OHBT	Δ.Α	
MBT	4,28	68,05
Άθροισμα	6,29	

Πίνακας 4.2 : Ποσοτικοποίηση βενζοθειαζολίων σε δείγμα απορροής δρόμου στη διαλυτή φάση και σωματιδιακή φάση (δειγματοληψία 04/01/07)

Διαλυτή φάση και σωματιδιακή φάση (δείγμα απορροής 04/01/07)				
Ενώσεις	μg/L (διαλυτή φάση)	Ποσοστό στη διαλυτή φάση (%)	μg/L (σωματιδιακή φάση)	Ποσοστό στη σωματιδιακή φάση(%)
ABT	0,03	0,48	0,02	0,22
BT	2,55	43,56	3,44	41,03
MTBT	Δ.Α		Δ.Α	
OHBT	Δ.Α		Δ.Α	
MBT	3,27	55,96	4,92	58,75
Άθροισμα	5,85		8,37	

Οι ενώσεις οι οποίες ανιχνεύθηκαν, όπως φαίνεται και από το *Σχήμα 4.1*, στα δείγματα απορροής δρόμου ήταν το ABT, το BT και το MBT.



Σχήμα 4.1 : Συγκεντρώσεις βενζοθειαζολίων στη διαλυτή και σωματιδιακή φάση από την απορροή δρόμου στη Χερσόνησο.

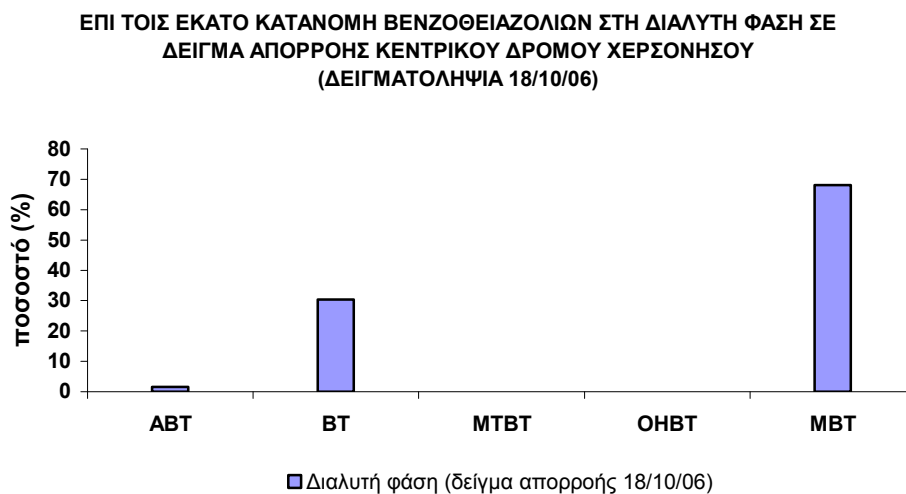
Παρατηρείται πως η συγκέντρωση του MBT στη διαλυτή φάση κατά τη δειγματοληψία 18/10/06 είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή της αντίστοιχης δειγματοληψίας στις 04/01/07, ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις BT και ABT παρουσιάζονται στις 04/01/07. Παρατηρούμε όμως πως δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά (περίπου 7%) των συγκεντρώσεων των βενζοθειαζολίων στις δυο αυτές δειγματοληψίες.

Έχει βρεθεί ότι το BT και το OHBT είναι σημαντικές οργανικές ενώσεις οι οποίες διυλίζονται από τα ελαστικά και την άσφαλο που επίσης, περιέχει 1-3% καουτσούκ (Reddy, 1997). Βέβαια, και στις δύο αυτές δειγματοληψίες δεν ανιχνεύθηκε το OHBT και αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαφοροποίηση ουσιών που χρησιμοποιούνται σε

διαφορετικές χώρες καθώς επίσης στην καθυστέρηση της ανάλυσης αυτών των δειγμάτων, αφού παραδόθηκαν στο εργαστήριο στις 29/01/07 συνεπώς υπάρχει πιθανότητα της διάσπασης της συγκεκριμένης ένωσης.

Τα βενζοθειαζόλια μπορούν να έχουν διυλιστεί στο δρόμο από τα ελαστικά μέρη των αυτοκινήτων, από ένα λεπτό στρώμα ελαστικών που χρησιμοποιείται στα πεζοδρόμια καθώς επίσης από την ασφαλτο ή από τη χρήση αντιψυκτικών (Reddy, 1997).

Στο Σχήμα 4.2 παρουσιάζεται γραφικά η επί τοις εκατό κατανομή των βενζοθειαζολίων στο δείγμα απορροής δρόμου 18/10/06.

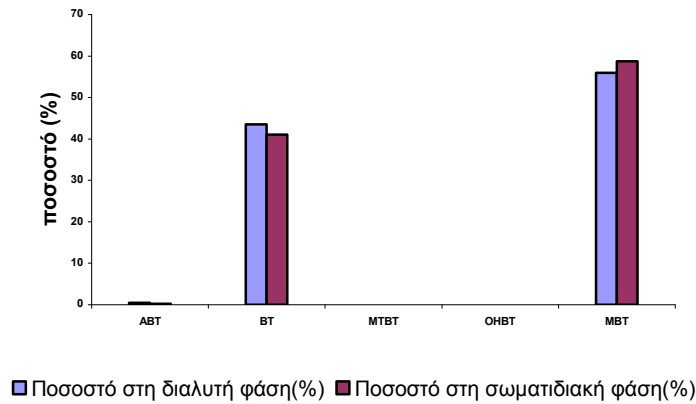


Σχήμα 4.2 : Επί τοις εκατό κατανομή βενζοθειαζολίων στη διαλυτή φάση (δειγματοληψία 18/10/06)

Στα δείγματα απορροής δρόμου που συλλέχθηκαν, το MBT και το BT είναι οι ενώσεις που βρίσκονται στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και αυτό γιατί αυτές είναι οι περισσότερο άφθονες ενώσεις στα ελαστικά (Gadd, 2003), που τελικά καταλήγουν στην απορροή των δρόμων.

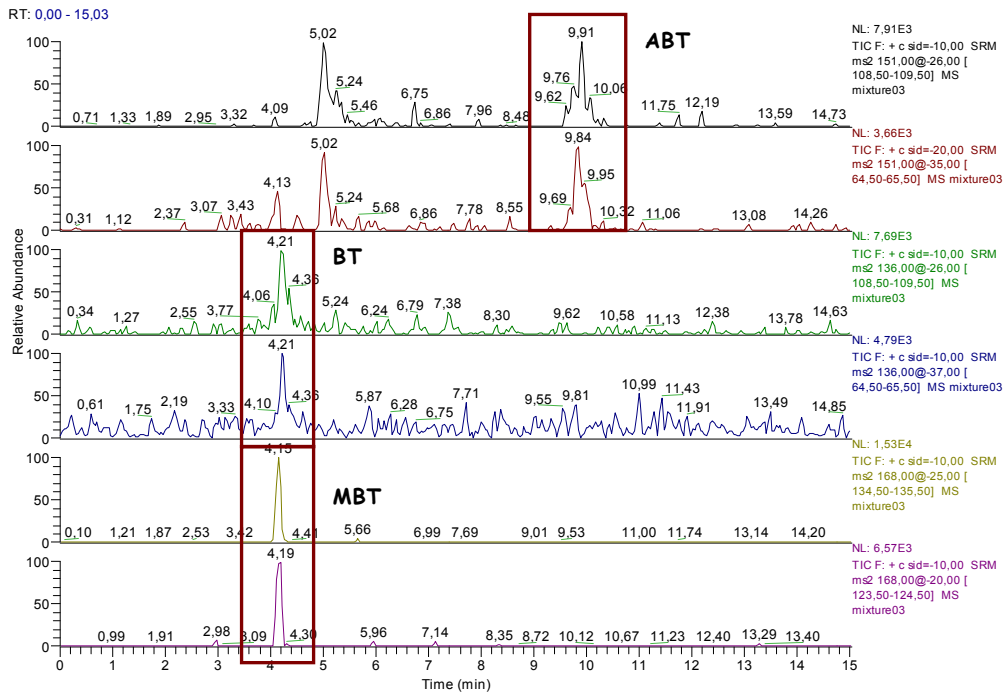
Στο Σχήμα 4.3 παρουσιάζεται γραφικά η επί τοις εκατό κατανομή των βενζοθειαζολίων στο δείγμα απορροής δρόμου 04/01/07, η οποία δεν αλλάζει σημαντικά αν συγκριθεί με την προηγούμενη δειγματοληψία.

ΕΠΙ ΤΟΙΣ ΕΚΑΤΟ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΒΕΝΖΟΘΕΙΑΖΟΛΙΩΝ ΣΤΗ
ΔΙΑΛΥΤΗ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΗ ΦΑΣΗ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ
ΑΠΟΡΡΟΗΣ ΔΡΟΜΟΥ (ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ 04/01/07)



Σχήμα 4.3 : Επί τοις εκατό κατανομή βενζοθειαζολίων στη διαλυτή φάση και σωματιδιακή φάση (δειγματοληψία 04/01/07)

Η εικόνα των βενζοθειαζολίων που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα απορροής 18/10/06 παριστάνεται στο Χρωματογράφημα 4.1.



Χρωματογράφημα 4.1 : Οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα απορροής 18/10/06

4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός βενζοθειαζολίων σε λάστιχα αυτοκινήτου

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα βενζοθειαζόλια χρησιμοποιούνται στα ελαστικά μέρη του αυτοκινήτου, στις ρόδες, ως προστατευτική επικάλυψη στα φρένα και σαν επιταχυντές.

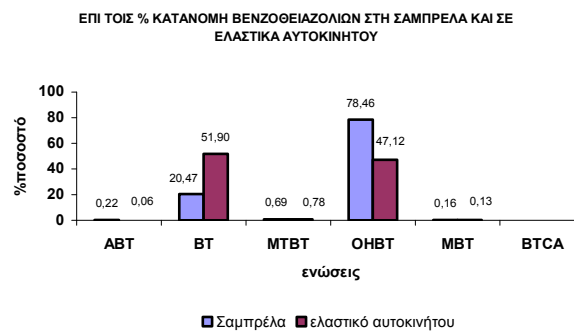
Για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση βενζοθειαζολίων σε ελαστικά, χρησιμοποιήθηκαν τεμαχισμένα κομμάτια λάστιχου από ρόδα αυτοκινήτου και σαμπρέλα και πραγματοποιήθηκε συνεχής εκχύλιση και στη συνέχεια εκχύλιση στερεάς φάσης (βλ. Κεφ. 2, §2.3, 2.4, 2.5).

Στον Πίνακα 4.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των βενζοθειαζολίων σε $\mu\text{g/g}$ και η επί τοις εκατό κατανομή τους.

Πίνακας 4.3 : Ποσοτικοποίηση βενζοθειαζολίων σε δείγματα από σαμπρέλα και λάστιχο αυτοκινήτου

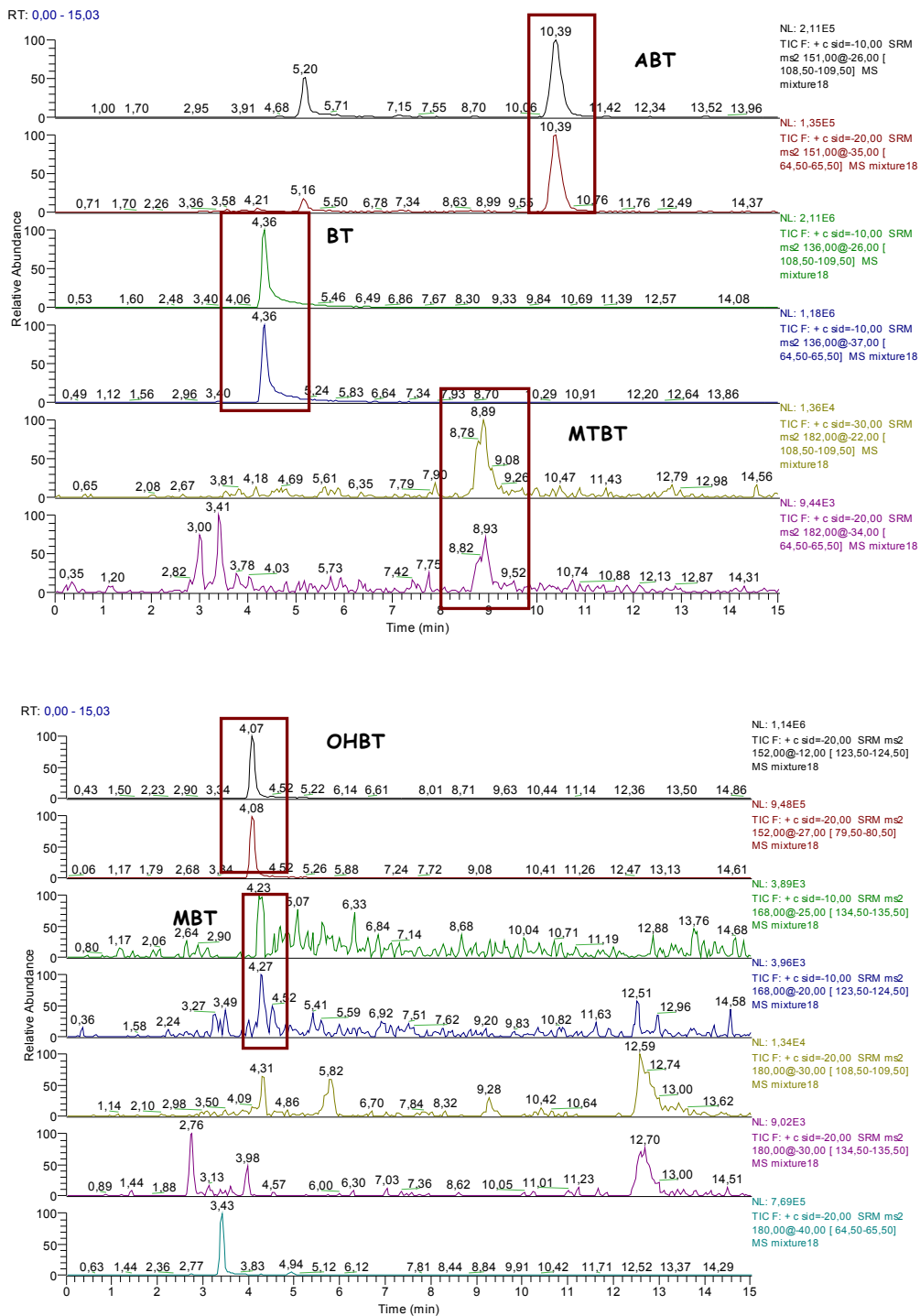
Ενώσεις	Σαμπρέλα $\mu\text{g/g}$	Ποσοστό (%)	ελαστικό αυτοκινήτου $\mu\text{g/g}$	Ποσοστό (%)
ΑΒΤ	0,08	0,22	0,05	0,06
ΒΤ	7,22	20,47	44,87	51,90
ΜΤΒΤ	0,24	0,69	0,67	0,78
ΟΗΒΤ	27,68	78,46	40,74	47,12
ΜΒΤ	0,05	0,16	0,12	0,13
ΒΤCΑ				
Άθροισμα	35,29		86,46	

Στο Σχήμα 4.4 παρουσιάζεται γραφικά η επί τοις εκατό κατανομή των βενζοθειαζολίων στα δύο αυτά δείγματα. Ανιχνεύθηκαν όλες οι ενώσεις εκτός από το ΒΤCΑ, όμως αυτές που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία είναι το ΒΤ και το ΟΗΒΤ, που όπως έχει αναφερθεί είναι σημαντικές οργανικές ενώσεις στα ελαστικά.



Σχήμα 4.4 : Επί τοις εκατό κατανομή βενζοθειαζολίων σε σαμπρέλα και ελαστικό αυτοκινήτου

Η εικόνα των βενζοθειαζολίων που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα σαμπρέλας παριστάνεται στο Χρωματογράφημα 4.2.



Χρωματογράφημα 4.2 : Ανίχνευση βενζοθειαζολίων σε δείγμα σαμπρέλας

4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός βενζοθειαζολίων σε εμπορικά προϊόντα

Τα εμπορικά προϊόντα στα οποία έγινε ποσοτικός προσδιορισμός βενζοθειαζολίων ήταν αντιψυκτικό αυτοκινήτου, απορρυπαντικό πλυντηρίου πιάτων calgonit και αποσκληρυντικό πλυντηρίου calgon.

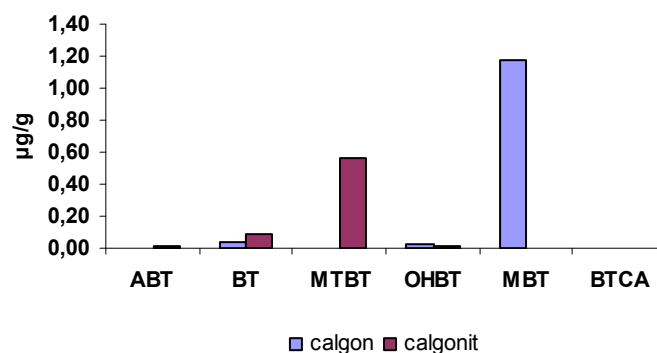
Οι ιδιότητες των υπό μελέτη ενώσεων τις καθιστά χρήσιμα πρόσθετα στα παραπάνω εμπορικά προϊόντα. Αυτό κυρίως οφείλεται στην ιδιότητά τους να προστατεύουν μεταλλικές επιφάνειες από την οξειδωση παρουσία υδάτινου περιβάλλοντος.

Στον Πίνακα 4.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των βενζοθειαζολίων στα εμπορικά προϊόντα καθώς και η επί τοις εκατό κατανομή τους.

Πίνακας 4.4 : Ποσοτικοποίηση και επί τοις εκατό κατανομή βενζοθειαζολίων σε εμπορικά προϊόντα

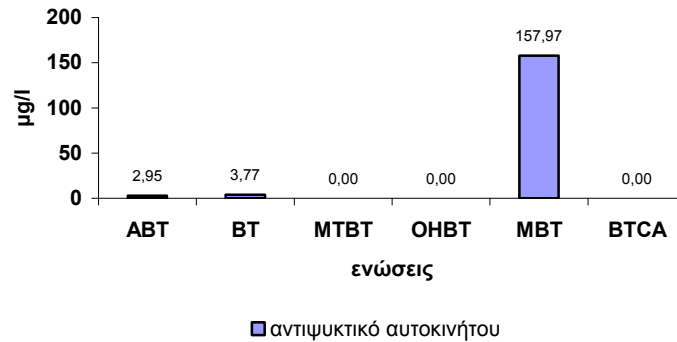
Ενώσεις	calgon μg/g	Ποσοστό (%)	calgonit μg/g	Ποσοστό (%)	αντιψυκτικό αυτοκινήτου μg/L	Ποσοστό (%)
ABT	Δ.Α		0,01	1,73	2,95	1,79
BT	0,03	2,79	0,09	12,76	3,77	2,29
MTBT	Δ.Α	0,00	0,57	83,59	Δ.Α	
OHBT	0,03	2,26	0,01	1,92	Δ.Α	
MBT	1,18	94,95	Δ.Α		157,97	95,92
BTCA	Δ.Α		Δ.Α		Δ.Α	
Άθροισμα	1,24		0,68		164,69	

Το αποσκληρυντικό πλυντηρίου calgon περιέχει το MBT, το BT και το OHBT σε μικρές ποσότητες ενώ το απορρυπαντικό πλυντηρίου πιάτων calgonit περιέχει το MTBT, BT, ABT και το OHBT (Σχήμα 4.5).



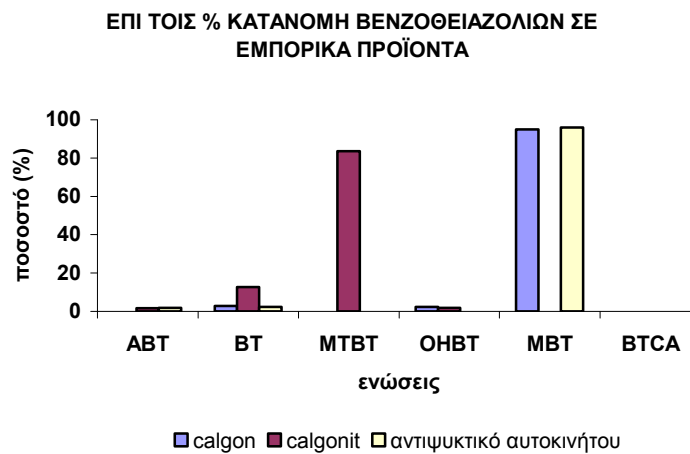
Σχήμα 4.5 : Ποσοτικός προσδιορισμός βενζοθειαζολίων στο calgon και calgonit

Το αντιψυκτικό αυτοκινήτου περιέχει σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό το MBT σε σχέση με τα ΒΤ και ΑΒΤ (Σχήμα 4.6) και παρουσιάζει πολύ υψηλή συγκέντρωση (Πίνακας 4.4).



Σχήμα 4.6 : Ποσοτικός προσδιορισμός βενζοθειαζολίων στο αντιψυκτικό αυτοκινήτου

Η επί τοις εκατό κατανομή των βενζοθειαζολίων σε εμπορικά προϊόντα παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.7. Το μεγαλύτερο ποσοστό στο calgon και στο αντιψυκτικό αυτοκινήτου βενζοθειαζολίων το παρουσιάζει το MBT, το οποίο έχει αντιδιαβρωτική δράση.



Σχήμα 4.7 : Επί τοις εκατό κατανομή βενζοθειαζολίων σε εμπορικά προϊόντα

ΚΕΦ 5. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΕΝΖΟΘΕΙΑΖΟΛΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΣΤΑΘΜΟΥ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ

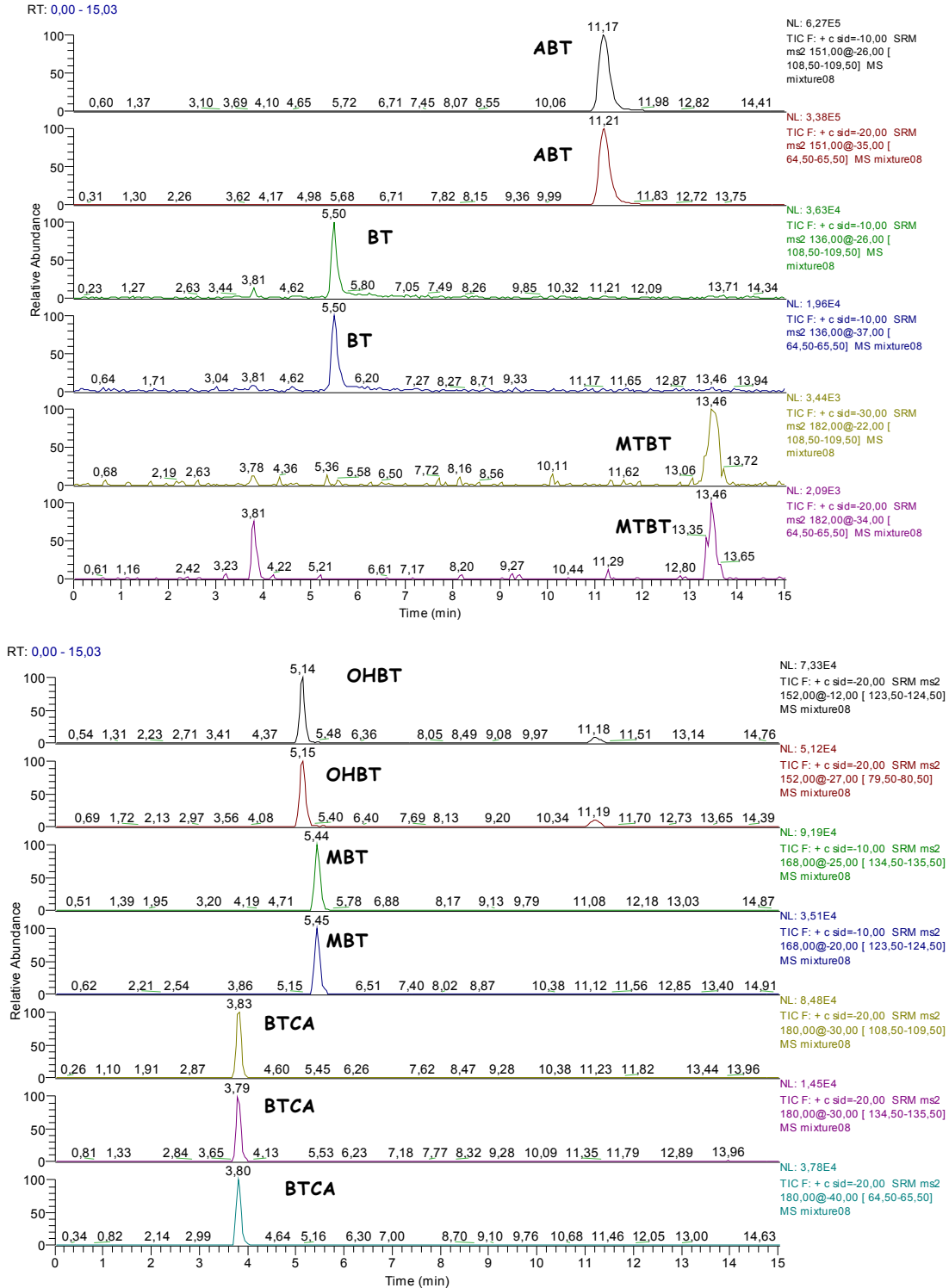
5.1 Ποιοτικός προσδιορισμός βενζοθειαζολίων σε δείγματα υγρών αποβλήτων

Στις 4/11/05 και 7/12/05 πραγματοποιήθηκαν δύο δειγματοληψίες στην εισροή του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου, ώστε να πραγματοποιηθεί ποιοτικός έλεγχος των βενζοθειαζολίων σε υγρά απόβλητα.

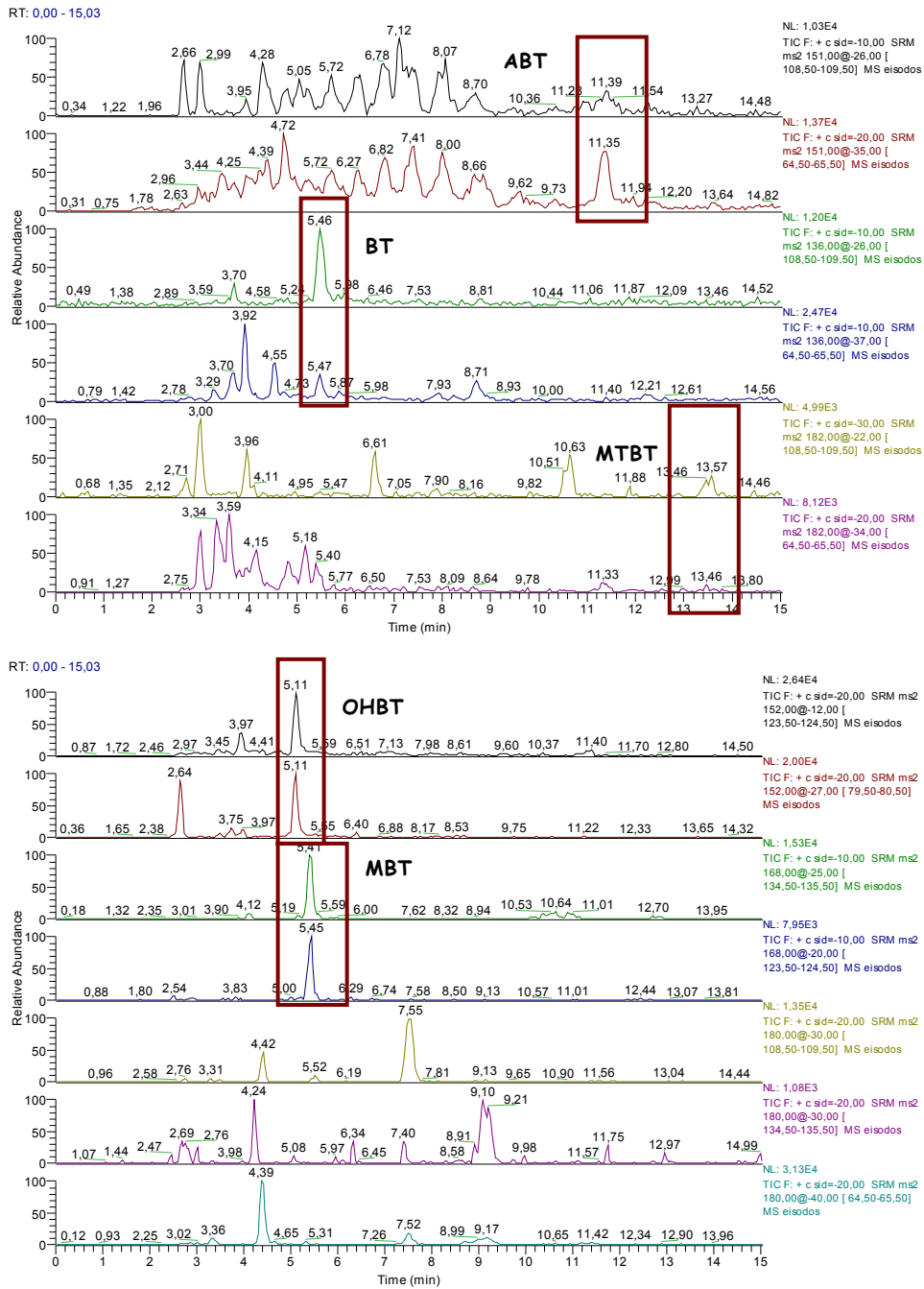
Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων και πραγματοποιήθηκε η ανάλυση στην HPLC-ES-MS/MS. Η εικόνα των βενζοθειαζολίων σε ένα πρότυπο διάλυμα 250ppb παριστάνεται στο *Χρωματογράφημα 5.1*.

Στο *Χρωματογράφημα 5.2* παρουσιάζεται η εικόνα των βενζοθειαζολίων σε δείγμα εισροής του βιολογικού καθαρισμού (07/12/05).

Παρατηρείται η ύπαρξη των ΒΤ, ΟΗΒΤ, ΜΒΤ ενώ για το ΑΒΤ και ΜΤΒΤ, που οι κορυφές τους δεν είναι τόσο ευδιάκριτες, πραγματοποιείται προσθήκη γνωστής ποσότητας αυτών των ενώσεων στο δείγμα. Μ' αυτό τον τρόπο, αν η κορυφή κάθε ιόντος αυξηθεί στο συγκεκριμένο χρόνο έκλουσης, σημαίνει πως και οι δυο αυτές ενώσεις υπάρχουν στο δείγμα.

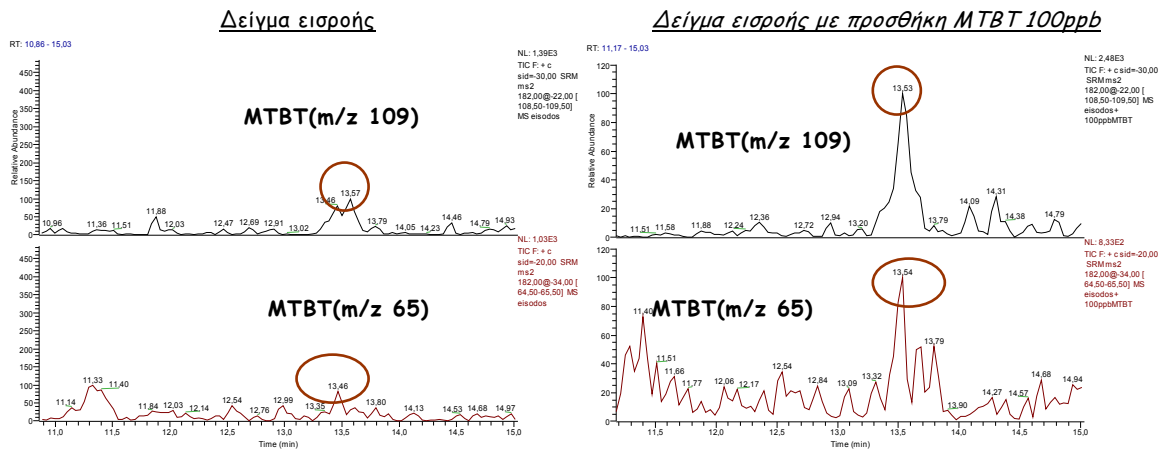


Χρωματογράφημα 5.1 : Πρότυπο διάλυμα 250 ppb βενζοθειαζολίων



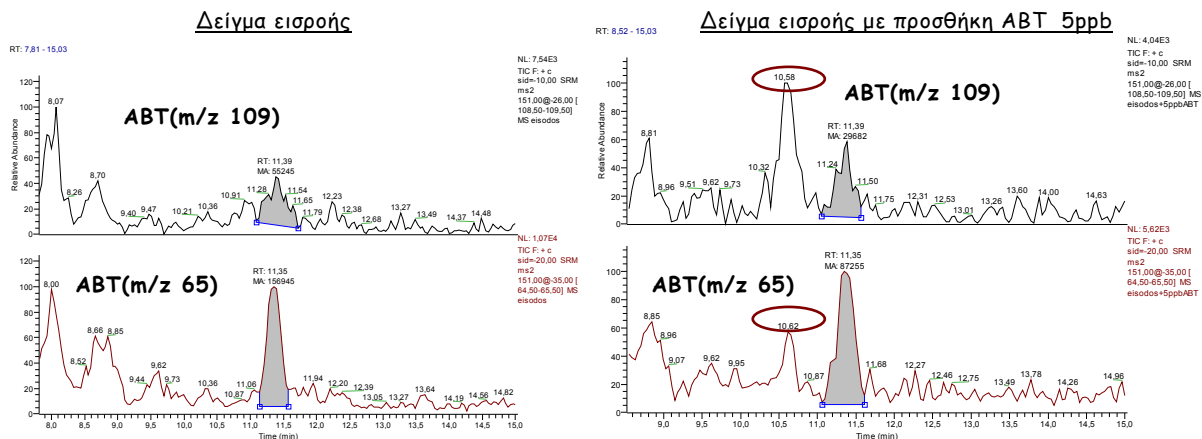
Χρωματογράφημα 5.2 : Δείγμα εισροής βιολογικού σταθμού Ηρακλείου (07/12/05)

Συνεπώς στο δείγμα εισροής (07/12/05) προστίθεται MTBT συγκέντρωσης 100 ppb και πράγματι παρατηρείται αύξηση της επιφάνειας των δύο ιόντων στο συγκεκριμένο χρόνο έκλουσης (Χρωματογράφημα 5.3).



Χρωματογράφημα 5.3 : Α. MTBT-Δείγμα εισροής βιολογικού σταθμού Ηρακλείου (07/12/05). Β. MTBT-Δείγμα εισροής βιολογικού σταθμού Ηρακλείου (07/12/05) με προσθήκη πρότυπης ένωσης συγκέντρωσης 100 ppb. Χρόνος έκλουσης του MTBT (m/z 182) 13,57 min.

Ακολουθείται η ίδια ακριβώς διαδικασία και για το ABT. Η προσθήκη αυτή τη φορά του ABT στο δείγμα είναι συγκέντρωσης 5ppb και η εικόνα του δείγματος εισροής με προσθήκη ABT παριστάνεται στο *Χρωματογράφημα 5.4*. Παρατηρείται ότι η επιφάνεια του πιθανού ABT στο δείγμα δεν αυξήθηκε με την προσθήκη πρότυπης ένωσης, αφού φαίνεται η ύπαρξη μίας νέας κορυφής σε διαφορετικό χρόνο έκλουσης, στα 10,58 min. Άρα διεξάγεται το συμπέρασμα ότι στο δείγμα εισροής του βιολογικού καθαρισμού (07/12/05) δεν υπάρχει ποσότητα του ABT.



Χρωματογράφημα 5.4 : Α. ABT-Δείγμα εισροής βιολογικού σταθμού Ηρακλείου (07/12/05). Β. ABT-Δείγμα εισροής βιολογικού σταθμού Ηρακλείου (07/12/05) με προσθήκη πρότυπης ένωσης συγκέντρωσης 5 ppb. Χρόνος έκλουσης του ABT (m/z 151) 11,39 min.

5.2 Επίδραση της μήτρας του δείγματος- Μέθοδος γνωστής προσθήκης

Οι μέθοδοι γνωστής προσθήκης (standard addition) είναι ιδιαίτερα χρήσιμες σε περιπτώσεις ανάλυσης πολύπλοκων δειγμάτων, για τα οποία υπάρχει μεγάλη πιθανότητα επίδρασης της μήτρας. Υπάρχουν αρκετές παραλλαγές της μεθόδου της γνωστής προσθήκης. Σε μια από τις πιο συνηθισμένες προβλέπεται η προσθήκη μιας ή περισσότερων δόσεων προτύπου διαλύματος (του αναλύτη) σε ίσες ποσότητες δείγματος. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται *εμβολιασμός* (spiking) του δείγματος. Στη συνέχεια κάθε διάλυμα αραιώνεται σε ορισμένο όγκο πριν από τη μέτρηση (Skooq, 2002).

Στην παρούσα εργασία, επειδή τα δείγματα του βιολογικού καθαρισμού είναι πολύπλοκα ελέγχεται κατά πόσο υπάρχει επίδραση της μήτρας, ώστε αν υπάρχει για την ποσοτικοποίηση των βενζοθειαζολίων να ακολουθηθεί η μέθοδος της γνωστής προσθήκης.

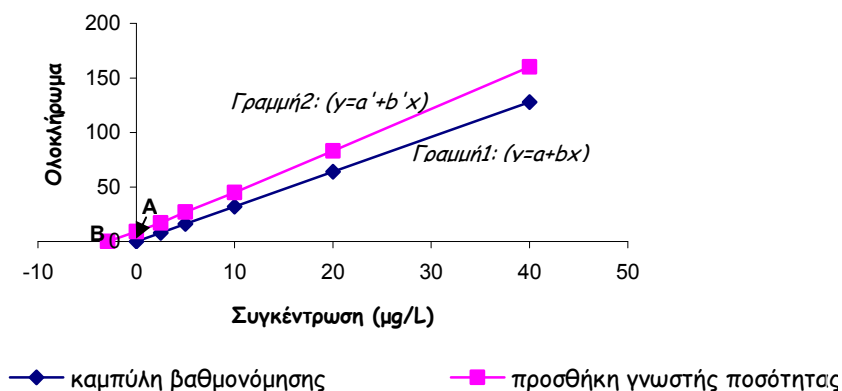
Με τον όρο επίδραση μήτρας, χαρακτηρίζονται οι φυσικές παρεμποδίσεις που οφείλονται στην αλλαγή των φυσικών ιδιοτήτων του διαλύματος (ιξώδους, πυκνότητας, επιφανειακής τάσης, τάσης ατμών διαλύματος) από ηλεκτρολύτες ή οργανικές ουσίες. Οι αλλαγές αυτές συνεπάγονται μεταβολές στην αποδοτικότητα του ψεκασμού, κι αυτό γιατί στην περίπτωση που η παρεμποδίζουσα ουσία είναι επιφανειοδραστική καταλαμβάνει χώρο πάνω στην σταγόνα κατά τον ηλεκτροψεκασμό και παρεμποδίζει την ουσία που μας ενδιαφέρει να περάσει στην αέρια ιονισμένη μορφή της, και συνεπώς το σήμα που λαμβάνεται γι' αυτήν να είναι μικρότερο από το πραγματικό. Επίσης, το σήμα μπορεί να παρουσιάζεται αυξημένο σε σχέση με το πραγματικό στην περίπτωση που μια ουσία δίνει ένα όμοιο θραύσμα με αυτά που έχουν επιλεγεί να παρακολουθούνται.

Ο έλεγχος της επίδρασης της μήτρας του δείγματος μπορεί να πραγματοποιηθεί ακολουθώντας τα παρακάτω βήματα:

1. Πραγματοποιούνται μετρήσεις προτύπων διαλυμάτων διαφόρων συγκεντρώσεων (20 ppb, 40 ppb, 80 ppb, 160 ppb και 320 ppb και ένα τυφλό), και βάσει των δεδομένων που προκύπτουν (ολοκλήρωματα) γίνεται κατασκευή καμπύλης αναφοράς. Στην καμπύλη αυτή παριστάνεται το ολοκλήρωμα που λαμβάνεται από κάθε δείγμα συναρτήσει της συγκέντρωσης. Η καμπύλη αυτή αντιστοιχεί στην γραμμή 1 του ακόλουθου Σχήματος 5.1 ($y=a+bx$).

2. Λαμβάνεται ποσότητα του αγνώστου δείγματος και μετρείται με την χρήση της ίδιας μεθόδου (το σήμα που λαμβάνεται αντιστοιχεί στο σημείο A στο Σχήμα 5.1).
3. Στην συνέχεια λαμβάνονται ποσότητες του αγνώστου δείγματος (δείγμα βιολογικού) και προστίθεται σ' αυτό ποσότητα από το πρότυπο διάλυμα με τρόπο ώστε να επιτευχθούν ίδιες συγκεντρώσεις με αυτές της καμπύλης αναφοράς (20, 40, 80, 160 και 320 ppb). Επίσης η προσθήκη γίνεται με τρόπο τέτοιο ώστε να μην προκληθεί σημαντική αλλαγή του όγκου ώστε να αποφευχθεί η αραίωση της μήτρας.
4. Από τα δεδομένα που λαμβάνονται κατά την μέτρηση των παραπάνω δειγμάτων, κατασκευάζεται δεύτερη καμπύλη (γραμμή 2: $y=a'+b'x$, Σχήμα 5.1).
5. Εάν η κλίση των δύο ευθειών διαφέρει σε ποσοστό μικρότερο του 10%, τότε θεωρείται ότι δεν υπάρχει παρεμπόδιση μήτρας και ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων μπορεί να γίνει με χρήση της καμπύλης βαθμονόμησης. Στην περίπτωση όμως που η διαφορά του παραπάνω ποσοστού είναι μεγαλύτερη του 10%, τότε η πραγματική ποσότητα των ενώσεων που μελετάμε αντιστοιχεί στο σημείο που η γραμμή 2 τέμνει τον οριζόντιο άξονα (σημείο B: απόλυτη τιμή του $x=-a'/b'$).

Η διαδικασία αυτή ακολουθείται για καθένα ιόν ξεχωριστά. Επίσης, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί στατιστική ανάλυση ώστε να ελεγχθεί κατά πόσο οι καμπύλες για το κάθε θραύσμα κάθε ένωσης είναι στατιστικά σημαντικές (Nischwitz, 2005).



Σχήμα 5.1 : Μελέτη ύπαρξης παρεμπόδισων μήτρας και υπολογισμός ποσότητας με τη μέθοδο γνωστής προσθήκης.

Ακολουθώντας την παραπάνω μέθοδο και ελέγχοντας τις κλίσεις των ευθειών (Παράρτημα I, Πίνακας 2Α-1, Σχήμα 2Α-1, 2Α-2) για κάθε ένωση καταλήγουμε στους Πίνακες 5.1-5.5. Παρατηρείται πως για κάποια θραύσματα η διαφορά των κλίσεων είναι μεγαλύτερη του 10%. Όμως κατά πόσο οι ευθείες κάθε ένωσης είναι στατιστικά σημαντικές;

Για τον έλεγχο, λοιπόν, ύπαρξης μήτρας θα πρέπει να πραγματοποιηθεί στατιστική ανάλυση των δεδομένων αυτών. Οι ενώσεις που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στο δείγμα εισόδου και εξόδου του βιολογικού καθαρισμού είναι το ΒΤ, το ΟΗΒΤ και το ΜΒΤ. Συνεπώς γι' αυτές τις τρεις ενώσεις θα γίνει περαιτέρω έλεγχος για την ύπαρξη μήτρας.

Πίνακας 5.1 : Διαφορά των κλίσεων σε δείγματα εισόδου (εισροή) και εξόδου (εκροή) του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου. Μελέτη ύπαρξης μήτρας για το ΑΒΤ

κλίση ΑΒΤ (m/z 109)	6564	κλίση ΑΒΤ (m/z 65)	2772,5	κλίση ΑΒΤ (m/z 109)	6564	κλίση ΑΒΤ (m/z 65)	2772,5
έξοδος+πρότυπα	6657,5	έξοδος+ πρότυπα	2671,5	είσοδος+πρότυπα	6505,9	είσοδος+ πρότυπα	2562,5
διαφορά των κλίσεων	93,5	διαφορά των κλίσεων	101	διαφορά των κλίσεων	58,1	διαφορά των κλίσεων	210
διαφορά των κλίσεων (%)	1,42	διαφορά των κλίσεων(%)	3,64	διαφορά των κλίσεων(%)	0,89	διαφορά των κλίσεων(%)	7,57

Πίνακας 5.2 : Διαφορά των κλίσεων σε δείγματα εισόδου (εισροή) και εξόδου (εκροή) του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου. Μελέτη ύπαρξης μήτρας για το ΒΤ

κλίση ΒΤ (m/z 109)	792,58	κλίση ΒΤ (m/z 65)	659,89	κλίση ΒΤ (m/z 109)	792,58	κλίση ΒΤ (m/z 65)	659,89
έξοδος+πρότυπα	917,86	έξοδος+ πρότυπα	625,22	είσοδος+ πρότυπα	868,91	είσοδος+ πρότυπα	799,94
διαφορά των κλίσεων	125,28	διαφορά των κλίσεων	34,67	διαφορά των κλίσεων	76,33	διαφορά των κλίσεων	140,05
διαφορά των κλίσεων(%)	13,65	διαφορά των κλίσεων (%)	5,25	διαφορά των κλίσεων(%)	8,78	διαφορά των κλίσεων(%)	17,51

Πίνακας 5.3 : Διαφορά των κλίσεων σε δείγματα εισόδου (εισροή) και εξόδου (εκροή) του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου. Μελέτη ύπαρξης μήτρας για το ΜΤΒΤ

κλίση ΜΤΒΤ (m/z 109)	89,073	κλίση ΜΤΒΤ (m/z 65)	75,676	κλίση ΜΤΒΤ (m/z 109)	89,073	κλίση ΜΤΒΤ (m/z 65)	75,676
έξοδος+πρότυπα	94,136	έξοδος+ πρότυπα	75,972	είσοδος+ πρότυπα	77,834	είσοδος+ πρότυπα	84,677
διαφορά των κλίσεων	5,063	διαφορά των κλίσεων	0,296	διαφορά των κλίσεων	11,239	διαφορά των κλίσεων	9,001
διαφορά των κλίσεων (%)	5,38	διαφορά των κλίσεων(%)	0,39	διαφορά των κλίσεων(%)	12,62	διαφορά των κλίσεων(%)	10,63

Πίνακας 5.4 : Διαφορά των κλίσεων σε δείγματα εισόδου (εισροή) και εξόδου (εκροή) του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου. Μελέτη ύπαρξης μήτρας για το ΟΗΒΤ

κλίση ΟΗΒΤ (m/z 124)	94,4	κλίση ΟΗΒΤ (m/z 80)	78,078	κλίση ΟΗΒΤ (m/z 124)	94,4	κλίση ΟΗΒΤ (m/z 80)	78,078
έξοδος+πρότυπα	73,164	έξοδος+ πρότυπα	75,725	είσοδος+ πρότυπα	159,28	είσοδος+ πρότυπα	94,639
διαφορά των κλίσεων	21,236	διαφορά των κλίσεων	2,353	διαφορά των κλίσεων	64,88	διαφορά των κλίσεων	16,561
διαφορά των κλίσεων (%)	22,50	διαφορά των κλίσεων (%)	3,01	διαφορά των κλίσεων (%)	40,73	διαφορά των κλίσεων (%)	17,50

Πίνακας 5.5 : Διαφορά των κλίσεων σε δείγματα εισόδου (εισροή) και εξόδου (εκροή) του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου. Μελέτη ύπαρξης μήτρας για το ΜΒΤ

κλίση ΜΒΤ (m/z 135)	459,91	κλίση ΜΒΤ (m/z 124)	162,19	κλίση ΜΒΤ (m/z 135)	459,91	κλίση ΜΒΤ (m/z 124)	162,19
έξοδος+πρότυπα	430,37	έξοδος+ πρότυπα	158,73	είσοδος+ πρότυπα	435,06	είσοδος+ πρότυπα	156,99
διαφορά των κλίσεων	29,54	διαφορά των κλίσεων	3,46	διαφορά των κλίσεων	24,85	διαφορά των κλίσεων	5,2
διαφορά των κλίσεων (%)	6,42	διαφορά των κλίσεων (%)	2,13	διαφορά των κλίσεων (%)	5,40	διαφορά των κλίσεων (%)	3,21

5.3 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων για τον έλεγχο παρεμποδίσεων της μήτρας του δείγματος

Οι περισσότερες αναλυτικές μέθοδοι βασίζονται σε μια καμπύλη αναφοράς στην οποία η μετρούμενη ποσότητα y παριστάνεται γραφικά ως συνάρτηση της γνωστής συγκέντρωσης x μιας σειράς προτύπων. Η σχέση που δημιουργείται για την εκτίμηση των τιμών της μεταβλητής y από τις τιμές της μεταβλητής x ονομάζεται **παλινδρόμηση**. Ανάλογα με το μαθηματικό υπόδειγμα που συνδέει τις δύο μεταβλητές η παλινδρόμηση διακρίνεται σε γραμμική και μη γραμμική (Κιόχος, 1998).

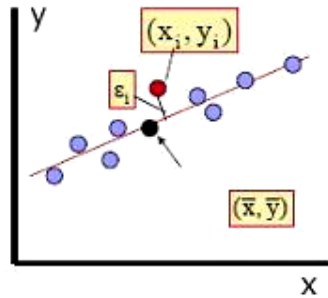
Η γραμμική παλινδρόμηση περιγράφεται με τη γνωστή εξίσωση της ευθείας γραμμής :

$$y_i = a + \beta x_i \text{ όπου } a \text{ και } \beta \text{ είναι παράμετροι}$$

Να σημειωθεί ωστόσο, ότι δεν βρίσκονται όλα τα δεδομένα ακριβώς πάνω στη γραμμή λόγω των τυχαίων σφαλμάτων στη διαδικασία μέτρησης. Χρησιμοποιείται η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων ώστε να βρεθεί η «βέλτιστη» ευθεία. Δεχόμαστε επίσης ότι οποιαδήποτε απόκλιση των επιμέρους σημείων από την ευθεία γραμμή προκύπτει από

σφάλμα στη μέτρηση του εμβαδού και ότι δεν υπάρχει σφάλμα στις τιμές του x - δηλαδή, οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων είναι επακριβώς γνωστές.

Η κάθετη απόκλιση κάθε σημείου από την ευθεία γραμμή ονομάζεται υπόλοιπο (residual) (Σχήμα 5.2). Η γραμμή που προκύπτει από τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων είναι εκείνη που ελαχιστοποιεί το άθροισμα των τετραγώνων των υπολοίπων όλων των σημείων.



Σχήμα 5.2 : Η εξίσωση της ευθείας $y_i = a + \beta x_i$ καθώς και η κάθετη απόκλιση κάθε σημείου από την ευθεία γραμμή (υπόλοιπο ε_i)

Για ευκολία ορίζουμε τρία μεγέθη S_{xx} , S_{yy} και S_{xy} ως ακολούθως :

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$$

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N}$$

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N}$$

Τα x_i και τα y_i είναι συντεταγμένες των επιμέρους δεδομένων, N είναι ο αριθμός των ζευγών των δεδομένων, που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς και \bar{x} και \bar{y} είναι οι μέσες τιμές των τιμών των μεταβλητών ή

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N} \text{ και } \bar{y} = \frac{\sum y_i}{N}$$

Τα S_{xx} , S_{yy} είναι το άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων των επιμέρους τιμών x και y από τη μέση τιμή και από αυτά μπορούν να υπολογιστούν :

1. Η κλίση a της γραμμής : $a = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$

2. Η τομή β της καμπύλης με τον άξονα y : $\bar{y} - \beta \bar{x}$

3. Η τυπική απόκλιση της παλινδρόμησης ή τυπικό σφάλμα (standard error) της εκτίμησης S_y των υπολοίπων ($y_c - ax - \beta$) :

$$s_y = \sqrt{\frac{S_{yy} - a^2 S_{xx}}{N - 2}}$$

4. Η τυπική απόκλιση S_a της κλίσης a :

$$s_a = \frac{s_y}{\sqrt{S_{xx}}}$$

5. Η τυπική απόκλιση S_β της τομής β :

$$s_\beta = s_y \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}} = s_y \sqrt{\frac{1}{N - \frac{(\sum x_i)^2}{\sum x_i^2}}}$$

6. Η τυπική απόκλιση S_c των αναλυτικών αποτελεσμάτων, που ελήφθησαν από τις παραμέτρους της προσαρμογής των δεδομένων των ελαχίστων τετραγώνων :

$$s_c = \frac{s_y}{a} \sqrt{\frac{1}{M} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{y}_c - \bar{y})^2}{a^2 S_{xx}}}$$

Η εξίσωση αυτή επιτρέπει τον υπολογισμό της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή \bar{y}_c , μιας ομάδας M επαναλαμβανόμενων αναλύσεων, όταν χρησιμοποιείται η καμπύλη αναφοράς που περιλαμβάνει N σημεία. \bar{y} είναι η μέση τιμή του y για N δεδομένα βαθμονόμησης (Skooog, 2002).

Αφού εκτιμηθούν οι παράμετροι του απλού γραμμικού μοντέλου για τις καμπύλες των προτύπων και των πραγματικών δειγμάτων θα ελεγχθεί αν οι ευθείες αυτές είναι στατιστικά σημαντικές.

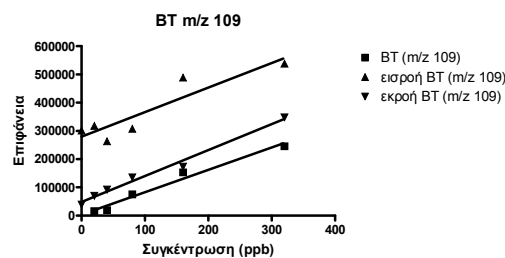
Οι παράμετροι των εξισώσεων για το ΒΤ τόσο για την καμπύλη των προτύπων όσο και για τις καμπύλες εισροής και εκροής του βιολογικού καθαρισμού με εμβολιασμό προτύπων παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.6.

Εκτιμώντας την P τιμή, χρησιμοποιώντας F -τεστ, ελέγχεται κατά πόσο οι εξισώσεις είναι στατιστικά σημαντικές. Η P τιμή απαντά στο ερώτημα : Εάν δεν υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ x και y , ποια είναι η πιθανότητα αυτά τα τυχαία σημεία να καταλήξουν σε γραμμική παλινδρόμηση. Αν η P τιμή είναι μικρότερη του 0,05 τότε η ευθεία είναι στατιστικά σημαντική. Στον Πίνακα 5.6 παρατηρείται ότι και στις τρεις εξισώσεις η P τιμή είναι μικρότερη του 0,05.

Πίνακας 5.6 : Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του ΒΤ για τον έλεγχο παρεμποδίσων μήτρας.

	ΒΤ (m/z 109)	εισροή ΒΤ (m/z 109)	εκροή ΒΤ (m/z 109)
Βέλτιστες τιμές			
Κλίση	792.6 ± 74.42	868.9 ± 191.0	917.9 ± 54.84
Υ-σημείο τομής	3581 ± 12290	279600 ± 28790	48320 ± 8269
Χ-σημείο τομής	-4,519	-321,8	-52,64
1/κλίση	0,001262	0,001151	0,001089
95% Διάστημα εμπιστοσύνης			
Κλίση	555.8 ως 1029	338.8 ως 1399	765.6 ως 1070
Υ-σημείο τομής όταν Χ=0.0	-35530 ως 42700	199700 ως 359500	25360 ως 71270
Χ-σημείο τομής όταν Υ=0.0	-71.38 ως 37.15	-995.5 ως -152.2	-89.44 ως -24.67
Ουσιαστική εφαρμογή			
r ²	0,9742	0,8381	0,9859
Sy.x	18160	51360	14750
Είναι η κλίση σημαντικά μη μηδενική:			
F	113,4	20,71	280,1
DFn, DFd	1.000, 3.000	1.000, 4.000	1.000, 4.000
P τιμή	0,0018	0,0104	< 0.0001
Απόκλιση από το μηδέν:	σημαντική	σημαντική	σημαντική
Δεδομένα			
Αριθμός τιμών στον άξονα Χ	5	6	6
Συνολικός αριθμός δεδομένων	5	6	6
Τιμή που δεν υπάρχει	1	0	0

Στο **Σχήμα 5.3** παρουσιάζεται γραφικά η καμπύλη των προτύπων του ΒΤ για το ιόν m/z 109 καθώς και οι καμπύλες εισόδου και εξόδου του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου με εμβολιασμό προτύπων διαλυμάτων.



Σχήμα 5.3 : Απεικόνιση της γραμμικής παλινδρόμησης για το ιόν m/z 109 του ΒΤ τόσο σε πρότυπα όσο και σε πραγματικά δείγματα.

Η κάθετη απόκλιση κάθε σημείου από την ευθεία γραμμή, δηλαδή το υπόλοιπο, για τις εξισώσεις του BT (m/z 109) παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.7.

Πίνακας 5.7 : Υπόλοιπο (residual) των ευθειών για το BT

Συγκέντρωση (ppb)	BT (m/z 109)	Εισροή BT (m/z 109)	Εκροή BT (m/z 109)
0		21540,06	-9151,257
20	-3665,962	20693,79	3484,535
40	-16179,51	-51174,48	7382,326
80	8258,4	-41653,02	13917,91
160	22800,22	70153,91	-22026,92
320	-11213,15	-19560,25	6393,41

Για να απαντηθεί το ερώτημα κατά πόσο επιδρά ή όχι η μήτρα στο δείγμα θα πρέπει να ελεγχθεί κατά πόσο οι κλίσεις είναι σημαντικά διαφορετικές. Αρχικά λοιπόν θα ελεγχθούν οι κλίσεις των προτύπων για το ιόν m/z 109 με την καμπύλη εισόδου (εισροή) του βιολογικού. Υπολογίζεται η P τιμή, χρησιμοποιώντας F τεστ με DFn οι βαθμοί ελευθερίας του αριθμητή και DFd οι βαθμοί ελευθερίας του παρανομαστή.

Αν η P τιμή είναι μεγαλύτερη από 0,05 εύστοχα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές δηλαδή οι γραμμές είναι σχεδόν παράλληλες ή ίδιες, συνεπώς δεν υπάρχει παρεμπόδιση μήτρας και η ποσοτικοποίηση των ενώσεων μπορεί να πραγματοποιηθεί με καμπύλη βαθμονόμησης.

Η P τιμή για τις εξισώσεις $y = 792,58x + 3581,4$ και $y = 868,91x + 279618$ υπολογίστηκε 0,744, με χρήση F τεστ ($F = 0,115433$. $DFn=1$ $DFd=7$), και είναι μεγαλύτερη του 0,05 συνεπώς οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές.

Δεδομένου ότι οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές, είναι δυνατό να υπολογιστεί μια κλίση για όλα τα στοιχεία. Η ενιαία κλίση είναι ίση με 834,454. Πάλι χρησιμοποιώντας F τεστ ($F = 149,544$. $DFn=1$ $DFd=8$) υπολογίζεται μια δεύτερη P τιμή που εξετάζει τη μηδενική υπόθεση ότι οι γραμμές είναι ίδιες. Εάν αυτή η P τιμή είναι χαμηλή καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι γραμμές δεν είναι ίδιες (είναι ευδιάκριτες αλλά παράλληλες). Αν η P τιμή είναι υψηλή τότε δεν υπάρχει δεδομένο ότι οι εξισώσεις είναι διαφορετικές.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση η P τιμή είναι μικρότερη του 0,0001 άρα συμπεραίνεται ότι δεν υπάρχει μόνο μια εξίσωση για όλα τα δεδομένα. Άρα, οι ευθείες θεωρούνται σχεδόν παράλληλες, συνεπώς δεν υφίσταται παρεμπόδιση μήτρας.

Στη συνέχεια θα ελεγχθεί η καμπύλη προτύπων για το ιόν m/z 109 με την καμπύλη εξόδου (εκροή) του βιολογικού καθαρισμού. Η εξίσωση της γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας διάφορες συγκεντρώσεις προτύπων, όπως ήδη προαναφέρθηκε, για την BT (m/z 109) είναι $y = 792,58x + 3581,4$ ενώ η εξίσωση του δείγματος της εκροής του βιολογικού καθαρισμού κάνοντας εμβολιασμό με πρότυπα είναι $y = 917,86x + 48317$. Η P τιμή για τις εξισώσεις αυτές υπολογίστηκε με χρήση F τεστ :

- $F = 1,92966$. $DFn=1$ $DFd=7$
 $P=0,2074 > 0,05$

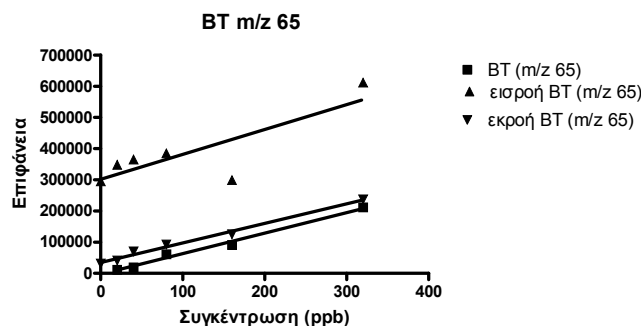
Συνεπώς, μπορούμε να διεξάγουμε το συμπέρασμα ότι οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές.

Δεδομένου ότι οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές, είναι δυνατό να υπολογιστεί μια κλίση για όλα τα στοιχεία. Η ενιαία κλίση είναι ίση με 861,306. Πάλι χρησιμοποιώντας F τεστ ($F = 31,8531$. $DFn=1$ $DFd=8$) υπολογίζεται μια δεύτερη P τιμή που εξετάζει τη μηδενική υπόθεση ότι οι γραμμές είναι ίδιες.

Η P τιμή ισούται με $P=0,0004849$ άρα συμπεραίνεται ότι δεν υπάρχει μόνο μια εξίσωση για όλα τα δεδομένα. Οι ευθείες θεωρούνται σχεδόν παράλληλες, συνεπώς δεν υφίσταται παρεμπόδιση μήτρας.

Εκτός από το ιόν m/z 109 του BT γίνεται έλεγχος και του ιόντος m/z 65 τόσο στην εισροή όσο και στην εκροή του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου (Παράρτημα I-2B).

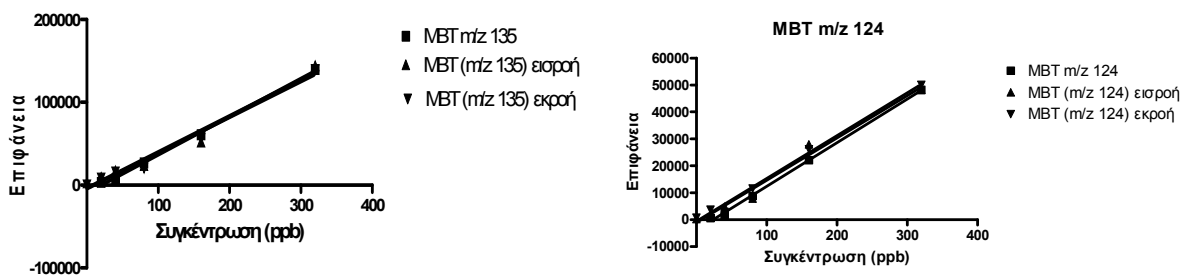
Στο Σχήμα 5.4 παρουσιάζονται γραφικά οι γραμμικές παλινδρομήσεις για το BT (m/z 65) (εισροή – εκροή - πρότυπα).



Σχήμα 5.4 : Απεικόνιση της γραμμικής παλινδρόμησης για το ιόν m/z 65 του BT τόσο σε πρότυπα όσο και σε πραγματικά δείγματα.

Μετά από την στατιστική ανάλυση (Παράρτημα I, Πίνακας 2B-1, 2B-2) καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως δεν υφίσταται παρεμπόδιση μήτρας για το BT (m/z 65) αφού οι ευθείες είναι σχεδόν παράλληλες.

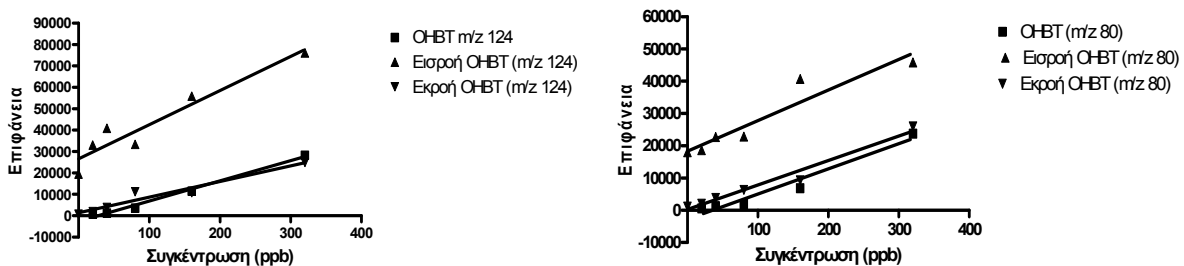
Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε τόσο για το MBT όσο και για το ΟΗΒΤ (Παράρτημα I-2B) και για τα δύο ιόντα που παρακολουθούνται. Οι βέλτιστες ευθείες του MBT για τα ιόντα m/z 135 και m/z 124 υπολογίστηκαν και πάλι με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων και παριστάνονται στο Σχήμα 5.5.



Σχήμα 5.5 : Απεικόνιση της γραμμικής παλινδρόμησης για τα ιόντα m/z 135 και m/z 124 του MBT τόσο σε πρότυπα όσο και σε πραγματικά δείγματα.

Μετά από την στατιστική ανάλυση (Παράρτημα I, Πίνακας 2B-3 έως 2B-6) τόσο για το ιόν m/z 135 όσο και για το m/z 124 στην εισροή και εκροή, συμπεραίνεται πως οι ευθείες είναι σχεδόν παράλληλες, συνεπώς δεν υφίσταται παρεμπόδιση μήτρας για το MBT.

Οι βέλτιστες ευθείες του ΟΗΒΤ για τα ιόντα m/z 124 και m/z 80 παριστάνονται στο Σχήμα 5.6.



Σχήμα 5.6 : Απεικόνιση της γραμμικής παλινδρόμησης για τα ιόντα m/z 124 και m/z 80 του ΟΗΒΤ τόσο σε πρότυπα όσο και σε πραγματικά δείγματα.

Οι ευθείες αυτές ελέγχονται όπως ακριβώς περιγράφηκε για το BT (m/z 109), και συμπεραίνεται πως ούτε το ΟΗΒΤ υφίσταται παρεμπόδιση μήτρας (Παράρτημα I, Πίνακας 2B-7 έως 2B-10).

Άρα, μετά τον παραπάνω έλεγχο, ο ποσοτικός προσδιορισμός των βενζοθειαζολίων σε δείγματα υγρών αποβλήτων θα πραγματοποιηθεί με καμπύλη βαθμονόμησης, αφού δεν υπάρχει παρεμπόδιση μήτρας για καμιά από τις ενώσεις που ελέγχθηκαν.

5.4 Ποσοτικός προσδιορισμός βενζοθειαζολίων σε δείγματα υγρών αποβλήτων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.2, στο βιολογικό καθαρισμό Ηρακλείου πραγματοποιήθηκε μια σειρά δειγματοληψιών για τον ποσοτικό προσδιορισμό βενζοθειαζολίων στην εισροή και εκροή του σταθμού.

Η πρώτη δειγματοληψία για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βενζοθειαζολίων πραγματοποιήθηκε στις 23/01/06 με χρήση καμπύλης βαθμονόμησης αφού πρώτα μελετήθηκε η ύπαρξη ή μη παρεμπόδισης μήτρας όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες παραγράφους. Η δειγματοληψία αυτή, ήταν ημερήσια ώστε να βρεθεί η μέγιστη συγκέντρωση βενζοθειαζολίων κατά τη διάρκεια της ημέρας.

Τα δείγματα κατά τη διάρκεια αυτής της δειγματοληψίας ήταν σύνθετα, αφού έγινε ανάμιξη στιγμιαίων δειγμάτων τόσο στην εισροή του βιολογικού καθαρισμού όσο και στην εκροή. Συλλέχθηκαν τέσσερα δείγματα εισόδου και εξόδου του βιολογικού σταθμού Ηρακλείου με χρήση του αυτόματου δειγματολήπτη του σταθμού κατά τις χρονικές περιόδους 8.30-14.30, 15.30-21.30, 22.30-4.30 και 5.30-7.30.

Η δεύτερη δειγματοληψία για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βενζοθειαζολίων πραγματοποιήθηκε στις 01/02/06. Εξαιτίας κάποιου προβλήματος στον αυτόματο δειγματολήπτη της εκροής του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου, συλλέχθηκε δείγμα μόνο στην εισροή του βιολογικού στις 14.30-15.30.

Η τρίτη και τέταρτη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκαν στις 08/02/06 και 13/02/06 αντίστοιχα, και τα δείγματα συλλέχθηκαν στην εισροή και εκροή του βιολογικού στις 14.00-15.00.

Στις τέσσερις αυτές δειγματοληψίες γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός τόσο στην διαλυτή όσο και στη σωματιδιακή φάση στην εισροή και στην εκροή του σταθμού. Σ' αυτό τον

πρώτο κύκλο δειγματοληψιών, δεν έχει γίνει προσθήκη GSH πριν την έναρξη διαδικασίας φιλτραρίσματος δειγμάτων. Η γλουταθειόνη προστέθηκε μόνο για την επεξεργασία της σωματιδιακής φάσης. Αντίθετα, στο δεύτερο κύκλο δειγματοληψιών, στα δείγματα εισροής και εκροής έγινε προσθήκη GSH (5ml GSH 0,1M σε όγκο 250ml δείγματος) εξαρχής, όταν τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο.

Στις 11/09/06 πραγματοποιείται η πέμπτη δειγματοληψία για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βενζοθειαζολίων. Η έκτη δειγματοληψία έγινε 2 μέρες μετά, στις 13/09/06, όμως εξαιτίας κάποιου προβλήματος στον αυτόματο δειγματολήπτη της εκροής του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου, συλλέχθηκε δείγμα μόνο στην εισροή του βιολογικού στις 13.00-14.00. Στη συγκεκριμένη δειγματοληψία ο ποσοτικός προσδιορισμός των βενζοθειαζολίων αφορά μόνο τη διαλυτή φάση του δείγματος και η προσθήκη της γλουταθειόνης πραγματοποιήθηκε πριν το φιλτράρισμά του.

Τέλος, η έβδομη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις 14/09/06 σε δείγματα εισροής και εκροής.

Θα πρέπει σε αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι στο δεύτερο κύκλο δειγματοληψιών δεν γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός της σωματιδιακής φάσης στην εισροή.

5.4.1 Διαλυτή φάση

Αφού ακολουθήθηκε η διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί στο Κεφάλαιο 2 στις Παραγράφους 2.3 και 2.4, τα δείγματα στη διαλυτή φάση του σταθμού μελετήθηκαν στο σύστημα HPLC-ES-MS/MS και τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης στην εισροή και στην εκροή του βιολογικού καθαρισμού παρατίθενται στον Πίνακα 5.8 και 5.9 αντίστοιχα. Έχει, επίσης, υπολογιστεί η επί τοις εκατό κατανομή βενζοθειαζολίων στη διαλυτή φάση ώστε να ελεγχθεί το ποσοστό της κάθε προς ανάλυση ένωσης στα δείγματα υγρών αποβλήτων (Πίνακας 5.10, 5.11).

Πίνακας 5.8 : Ποσοτικοποίηση βενζοθειαζολίων της εισροής του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου κατά τη διαλυτή φάση

α/α	Δειγματοληψίες	Εισροή-Διαλυτή φάση (μg/L)							
		Ώρα	ΑΒΤ	ΒΤ	ΜΤΒΤ	ΟΗΒΤ	ΜΒΤ	ΒΤСА	Άθροισμα
1α		8.30-14.30	0,04	0,43	0,89	1,32	0,11	Δ.Α	2,79
1β	23/1/2006	15.30-21.30	0,03	0,27	0,70	1,74	0,09	Δ.Α	2,84
1γ		22.30-4.30	Δ.Α ¹	0,26	0,71	1,19	Δ.Α	Δ.Α	2,15
1δ		5.30-7.30	Δ.Α	0,11	0,54	0,47	Δ.Α	Δ.Α	1,11
2	1/2/2006	14.30-15.30	0,06	0,52	0,40	1,26	0,08	Δ.Α	2,32
3	8/2/2006	14.00-15.00	Δ.Α	0,34	0,27	2,18	0,12	Δ.Α	2,91
4	13/2/2006	14.00-15.00	0,07	0,37	0,20	0,69	0,08	Δ.Α	1,42
5	11/9/2006	13.00-14.00	Δ.Α	0,63	0,68	0,44	0,76	Δ.Α	2,50
6	13/9/2006	13.00-14.00	Δ.Α	0,75	0,62	0,68	0,85	Δ.Α	2,90
7	14/9/2006	11.00	Δ.Α	0,64	0,47	0,55	0,71	Δ.Α	2,36

¹ : Δεν ανιχνεύθηκε

Πίνακας 5.9 : Ποσοτικοποίηση βενζοθειαζολίων της εκροής του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου κατά την διαλυτή φάση

α/α	Δειγματοληψίες	Εκροή - Διαλυτή φάση (μg/L)							
		Ώρα	ΑΒΤ	ΒΤ	ΜΤΒΤ	ΟΗΒΤ	ΜΒΤ	ΒΤСА	Άθροισμα
1α		8.30-14.30	0,01	1,18	0,57	3,92	Δ.Α	Δ.Α	5,69
1β	23/1/2006	15.30-21.30	0,01	0,22	0,52	0,74	Δ.Α	Δ.Α	1,49
1γ		22.30-4.30	Δ.Α	0,13	0,71	1,37	0,09	Δ.Α	2,30
1δ		5.30-7.30	Δ.Α	0,22	0,60	1,45	Δ.Α	Δ.Α	2,27
2	1/2/2006	14.30-15.30							
3	8/2/2006	14.00-15.00	Δ.Α	0,10	0,18	0,19	0,05	Δ.Α	0,53
4	13/2/2006	14.00-15.00							
5	11/9/2006	13.00-14.00	Δ.Α	0,66	0,44	0,66	0,74	Δ.Α	2,50
6	13/9/2006	13.00-14.00							
7	14/9/2006	11.00	Δ.Α	0,46	0,41	0,59	0,62	Δ.Α	2,08

Θα πρέπει να αναφερθεί πως αφού στις πρώτες τέσσερις δειγματοληψίες δεν έγινε η προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας γλουταθειόνης πριν την έναρξη της διαδικασίας φιλτραρίσματος, κατά την ποσοτικοποίηση του ΜΒΤ λάβαμε υπόψη μας την ανάκτηση χωρίς τη GSH.

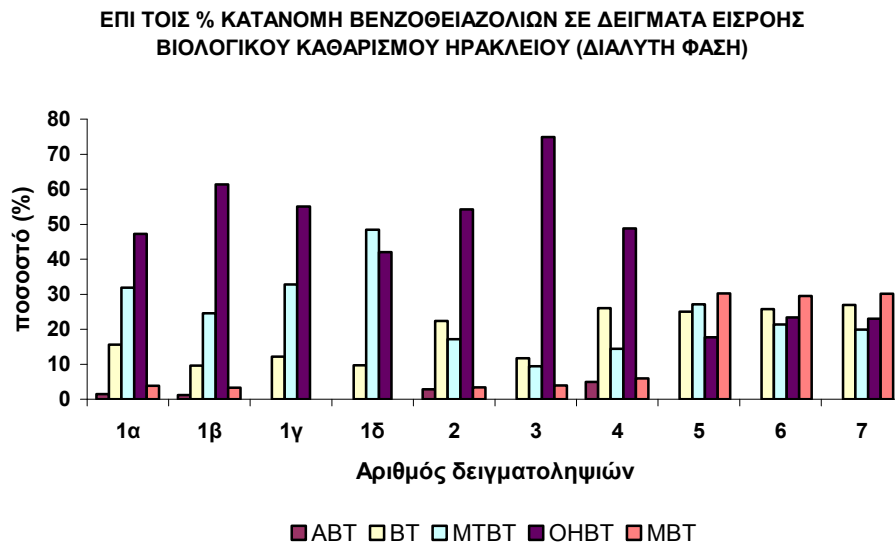
Πίνακας 5.10 : Επί τοις % κατανομή βενζοθειαζολίων της εισροής του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου κατά την διαλυτή φάση στις επτά δειγματοληψίες.

Εισροή-Διαλυτή φάση (Επί τοις % κατανομή βενζοθειαζολίων)								
a/a	Δειγματοληψίες	Ώρα	ABT	BT	MTBT	OHBT	MBT	BTCA
1α		8.30-14.30	1,42	15,58	31,91	47,21	3,87	
1β	23/1/2006	15.30-21.30	1,23	9,60	24,56	61,33	3,28	
1γ		22.30-4.30	0,00	12,15	32,76	55,10	0,00	
1δ		5.30-7.30	0,00	9,64	48,39	41,97	0,00	
2	1/2/2006	14.30-15.30	2,79	22,41	17,14	54,25	3,41	
3	8/2/2006	14.00-15.00	0,00	11,70	9,41	74,92	3,96	
4	13/2/2006	14.00-15.00	4,90	25,99	14,40	48,80	5,92	
5	11/9/2006	13.00-14.00	0,00	25,00	27,09	17,69	30,22	
6	13/9/2006	13.00-14.00	0,00	25,78	21,36	23,36	29,50	
7	14/9/2006	11.00	0,00	26,92	19,88	23,06	30,15	

Πίνακας 5.11 : Επί τοις % κατανομή βενζοθειαζολίων της εκροής του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου κατά τη διαλυτή φάση στις επτά δειγματοληψίες.

Εκροή - Διαλυτή φάση (Επί τοις % κατανομή βενζοθειαζολίων)								
a/a	Δειγματοληψίες	Ώρα	ABT	BT	MTBT	OHBT	MBT	BTCA
1α		8.30-14.30	0,22	20,71	10,05	69,01	0,00	
1β	23/1/2006	15.30-21.30	0,86	14,53	35,11	49,51	0,00	
1γ		22.30-4.30	0,00	5,63	30,76	59,48	4,13	
1δ		5.30-7.30	0,00	9,50	26,67	63,84	0,00	
2	1/2/2006	14.30-15.30						
3	8/2/2006	14.00-15.00	0,00	19,12	34,75	36,19	9,93	
4	13/2/2006	14.00-15.00						
5	11/9/2006	13.00-14.00	0,00	26,23	17,68	26,54	29,55	
6	13/9/2006	13.00-14.00						
7	14/9/2006	11.00	0,00	22,22	19,78	28,27	29,74	

Στο Σχήμα 5.7 παρατίθενται γραφικά η επί τοις εκατό κατανομή των βενζοθειαζολίων στην εισροή του βιολογικού καθαρισμού. Παρατηρείται πως σε μεγαλύτερη αφθονία στις τέσσερις πρώτες δειγματοληψίες είναι το 2-υδρόξυβενζοθειαζόλιο (OHBT). Κατά τη διάρκεια της πρώτης δειγματοληψίας (αριθμός δειγματοληψιών 1α, 1β, 1γ, 1δ) ακολουθεί το 2-μεθυλθείοβενζοθειαζόλιο (MTBT), το βενζοθειαζόλιο (BT), το 2-μέρκαπτοβενζοθειαζόλιο (MBT) και τέλος το 2-άμινοβενζοθειαζόλιο (ABT). Στη δεύτερη, τρίτη και τέταρτη δειγματοληψία η μεγαλύτερη σε ποσοστό ένωση μετά το OHBT είναι το BT και ακολουθεί το MTBT. Το ABT και το MBT βρίσκονται σε πολύ μικρότερο ποσοστό.



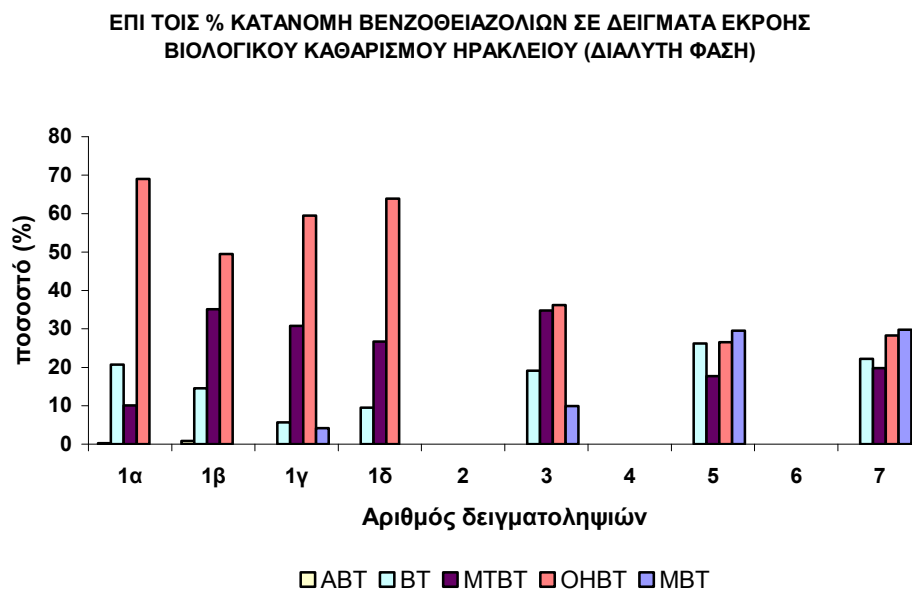
Σχήμα 5.7 : Επί τοις εκατό κατανομή βενζοθειαζολίων στην εισροή του βιολογικού καθαρισμού στις επτά δειγματοληψίες.

Η ίδια ακριβώς εικόνα παρουσιάζεται στο *Σχήμα 5.8*, στην εκροή του βιολογικού καθαρισμού με το OHBT να υπερέχει και πάλι ποσοτικά στην πρώτη δειγματοληψία καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας και η ίδια εικόνα να παρουσιάζεται και στην τέταρτη δειγματοληψία. Προκύπτει λοιπόν, το συμπέρασμα ότι τις συγκεκριμένες ημέρες τα απόβλητα που εισήλθαν στο χώρο του βιολογικού σταθμού περιείχαν μεγαλύτερη ποσότητα OHBT τόσο στην είσοδο όσο και στην έξοδο του σταθμού.

Το OHBT, επίσης, εμφανίζει μεγάλη διαλυτότητα στο νερό (2354mg/L) (Kirouani-Harani, 2003) σε σχέση με τα ABT, MBT, MTBT γεγονός το οποίο επαληθεύεται στις πρώτες τέσσερις δειγματοληψίες. Το BT, βέβαια, η περισσότερο διαλυτή ένωση στο νερό (4300 mg/L) φαίνεται ότι βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση από το OHBT σε αυτά τα δείγματα (1^η δειγματοληψία έως και την 4^η δειγματοληψία). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να δικαιολογηθεί από τη διαφορά της ποιότητας (πηγής) των λυμάτων τα οποία εισέρχονται στο χώρο του βιολογικού σταθμού και τα οποία προέρχονται από διαφορετικές πηγές και με διαφορετικές χρήσεις χημικών παρασκευασμάτων τα οποία περιέχουν τις ενώσεις αυτές. Επίσης, η αυξημένη πτητικότητα του BT, δικαιολογεί τη μειωμένη συγκέντρωσή του σε σχέση με το OHBT αφού υπάρχει πιθανότητα εξάτμισής του κατά τη διάρκεια χρήσης αζώτου στα δείγματα.

Θα πρέπει να τονισθεί, επίσης, ότι τα αποτελέσματα στην εισροή και εκροή του σταθμού δεν είναι συγκρίσιμα, αφού στο συγκεκριμένο χρόνο το δείγμα εισόδου και εξόδου είναι

διαφορετικό, καθώς ο υδραυλικός χρόνος στην εγκατάσταση βιολογικού καθαρισμού είναι περίπου 24 ώρες. Άρα, σε καμιά περίπτωση δεν αναμένεται μείωση της συνολικής συγκέντρωσης των βενζοθειαζολίων στην έξοδο του βιολογικού καθαρισμού σε σχέση με την είσοδο στο συγκεκριμένο χρόνο μετά από την επεξεργασία στο σταθμό, αφού τα δείγματα είναι διαφορετικά. Αυτό ήδη παρατηρείται στα αποτελέσματα των Πινάκων 5.8 και 5.9 με το άθροισμα της συγκέντρωσης των βενζοθειαζολίων πολλές φορές μεγαλύτερο στην εκροή του βιολογικού σε σχέση με την εισροή.



Σχήμα 5.8 : Επί τοις εκατό κατανομή βενζοθειαζολίων στην εκροή του βιολογικού καθαρισμού κατά τη διάρκεια των επτά δειγματοληψιών.

Στην εισροή του βιολογικού καθαρισμού κατά τη διάρκεια της 6^{ης} και 7^{ης} δειγματοληψίας το MBT, όπως και στην 5^η δειγματοληψία, βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό. Ακολουθούν το BT, το OHBT και το MTBT ενώ στην 5^η δειγματοληψία το MTBT ακολουθείται μετά το MBT, στη συνέχεια το BT και τέλος το OHBT.

Στην εκροή του βιολογικού καθαρισμού τόσο στην 5^η όσο και στην 7^η δειγματοληψία το MBT φαίνεται να υπερέχει και πάλι. Ακολουθούν το OHBT, το BT και το MTBT ενώ τα ABT και BTCA δεν ανιχνεύθηκαν.

Η αλλαγή της εικόνας των βενζοθειαζολίων κατά την 5^η, 6^η και 7^η δειγματοληψία σε σχέση με τις προηγούμενες μπορεί εκτός από τη διαφορετική προέλευση των δειγμάτων να οφείλεται και στην προσθήκη GSH πριν τη διαδικασία φιλτραρίσματος. Το MBT δεν

οξειδώνεται πλέον, και η ανάκτηση σε αυτές τις τρεις δειγματοληψίες είναι διαφορετική σε σχέση με τις υπόλοιπες.

5.4.2 Σωματιδιακή φάση

Αφού ακολουθήθηκε η διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί για την σωματιδιακή φάση στο Κεφάλαιο 2 στις Παραγράφους 2.3, 2.4 και 2.5 τα δείγματα στη σωματιδιακή φάση του σταθμού μελετήθηκαν στο σύστημα HPLC-ES-MS/MS και τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης παρατίθενται στον Πίνακα 5.12 και 5.13 για την εισροή και εκροή του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου. Έχει, επίσης, υπολογιστεί η επί τοις εκατό κατανομή βενζοθειαζολίων στη σωματιδιακή φάση ώστε να ελεγχθεί το ποσοστό της κάθε προς ανάλυση ένωσης στα δείγματα (Πίνακας 5.14 και 5.15).

Τα αποτελέσματα παρατίθενται σε $\mu\text{g/L}$ και όχι σε $\mu\text{g/g}$ για να είναι συγκρίσιμα με τη διαλυτή φάση που ήδη παρουσιάστηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

Πίνακας 5.12 : Ποσοτικοποίηση βενζοθειαζολίων της εισροής του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου κατά τη σωματιδιακή φάση

α/α	Δειγματοληψίες	Εισροή-Σωματιδιακή φάση ($\mu\text{g/L}$)							Άθροισμα	
		Ώρα	ABT	BT	MTBT	OHBT	MBT	BTCA		
1α	23/1/2006	8.30-14.30	Δ.Α	1,44	Δ.Α	0,19	Δ.Α	Δ.Α	1,63	
1β		15.30-21.30	Δ.Α	2,00	Δ.Α	0,20	Δ.Α	Δ.Α	2,21	
1γ		22.30-4.30	Δ.Α	1,86	Δ.Α	0,09	0,41	Δ.Α	2,36	
1δ	1/2/2006	5.30-7.30	Δ.Α	1,00	Δ.Α	0,18	0,57	0,23	1,98	
2		14.30-15.30	Δ.Α	12,28	Δ.Α	0,47	0,69	Δ.Α	13,44	
3		8/2/2006	14.00-15.00	Δ.Α	9,61	Δ.Α	0,26	Δ.Α	Δ.Α	9,88
4		13/2/2006	14.00-15.00	Δ.Α	4,79	Δ.Α	0,00	0,39	Δ.Α	5,18
5		11/9/2006	13.00-14.00							
6		13/9/2006	13.00-14.00							
7		14/9/2006	11.00							

Πίνακας 5.13 : Ποσοτικοποίηση βενζοθειαζολίων της εκροής του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου κατά τη σωματιδιακή φάση

Εκροή-Σωματιδιακή φάση (μg/L)									
α/α	Δειγματοληψίες	Ώρα	ΑΒΤ	ΒΤ	ΜΤΒΤ	ΟΗΒΤ	ΜΒΤ	ΒΤCΑ	Άθροισμα
1α		8.30-14.30	Δ.Α	3,72	Δ.Α	5,35	0,86	3,88	13,80
1β	23/1/2006	15.30-21.30	Δ.Α	1,16	Δ.Α	0,24	1,25	0,37	3,02
1γ		22.30-4.30	Δ.Α	2,12	Δ.Α	0,32	3,45	0,48	6,38
1δ		5.30-7.30	Δ.Α	1,31	Δ.Α	0,23	7,05	Δ.Α	8,60
2	1/2/2006	14.30-15.30							
3	8/2/2006	14.00-15.00	Δ.Α	0,85	Δ.Α	0,51	0,00	Δ.Α	1,36
4	13/2/2006	14.00-15.00	Δ.Α	0,80	Δ.Α	0,28	0,39	Δ.Α	1,47
5	11/9/2006	13.00-14.00	Δ.Α	0,74	0,27	Δ.Α	0,03	Δ.Α	1,05
6	13/9/2006	13.00-14.00							
7	14/9/2006	11.00	Δ.Α	0,79	0,19	0,37	0,24	Δ.Α	1,59

Θα πρέπει να αναφερθεί πως στις τέσσερις πρώτες δειγματοληψίες, στη σωματιδιακή φάση έγινε η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας γλουταθειόνης πριν την έναρξη της εκχύλισης στερεάς φάσης. Επίσης, επειδή τα δείγματα εισροής ήταν θολά και περιείχαν λιπίδια, έγινε χρήση πεντανίου, άρα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βενζοθειαζολίων στα συγκεκριμένα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η ανάκτηση που παρουσιάζεται στην Παράγραφο 3.6 με χρήση πεντανίου.

Πίνακας 5.14 : Επί τοις % κατανομή βενζοθειαζολίων στην εισροή του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου κατά τη σωματιδιακή φάση στις επτά δειγματοληψίες.

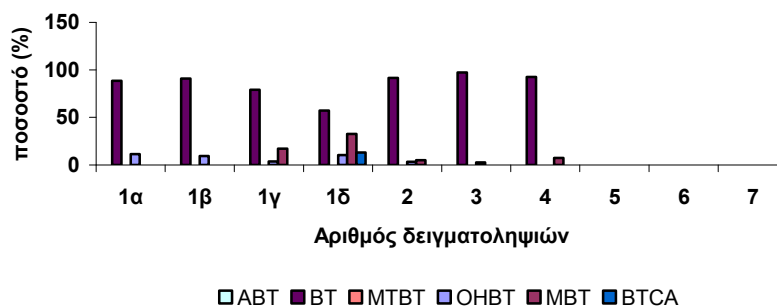
Εισροή-Σωματιδιακή φάση (Επί τοις % κατανομή βενζοθειαζολίων)								
α/α	Δειγματοληψίες	Ώρα	ΑΒΤ	ΒΤ	ΜΤΒΤ	ΟΗΒΤ	ΜΒΤ	ΒΤCΑ
1α		8.30-14.30	Δ.Α	88,51	Δ.Α	11,49	Δ.Α	Δ.Α
1β	23/1/2006	15.30-21.30	Δ.Α	90,72	Δ.Α	9,28	Δ.Α	Δ.Α
1γ		22.30-4.30	Δ.Α	78,90	Δ.Α	3,79	17,31	Δ.Α
1δ		5.30-7.30	Δ.Α	50,37	Δ.Α	9,18	28,80	11,66
2	1/2/2006	14.30-15.30	Δ.Α	91,38	Δ.Α	3,51	5,10	Δ.Α
3	8/2/2006	14.00-15.00	Δ.Α	97,33	Δ.Α	2,67	Δ.Α	Δ.Α
4	13/2/2006	14.00-15.00	Δ.Α	92,47	Δ.Α	0,00	7,53	Δ.Α
5	11/9/2006	13.00-14.00						
6	13/9/2006	13.00-14.00						
7	14/9/2006	11.00						

Πίνακας 5.15 : Επί τοις % κατανομή βενζοθειαζολίων στην εκροή του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου κατά τη σωματιδιακή φάση στις επτά δειγματοληψίες.

Εκροή-Σωματιδιακή φάση (Επί τοις % κατανομή βενζοθειαζολίων)								
a/a	Δειγματοληψίες	Ώρα	ABT	BT	MTBT	OHBT	MBT	BTCA
1α		8.30-14.30	Δ.Α	26,96	Δ.Α	38,76	6,21	28,08
1β	23/1/2006	15.30-21.30	Δ.Α	38,41	Δ.Α	7,96	41,46	12,17
1γ		22.30-4.30	Δ.Α	33,31	Δ.Α	5,02	54,11	7,56
1δ		5.30-7.30	Δ.Α	15,24	Δ.Α	2,73	82,03	Δ.Α
2	1/2/2006	14.30-15.30						
3	8/2/2006	14.00-15.00	Δ.Α	62,71	Δ.Α	37,29	Δ.Α	Δ.Α
4	13/2/2006	14.00-15.00	Δ.Α	54,42	Δ.Α	19,05	26,53	Δ.Α
5	11/9/2006	13.00-14.00	Δ.Α	70,83	25,86	0,00	3,31	Δ.Α
6	13/9/2006	13.00-14.00						
7	14/9/2006	11.00	Δ.Α	49,99	11,92	23,11	14,98	Δ.Α

Στο *Σχήμα 5.9* παρουσιάζεται γραφικά η επί τοις εκατό κατανομή των βενζοθειαζολίων στην εισροή του βιολογικού καθαρισμού κατά τη σωματιδιακή φάση. Παρατηρείται πως αυτή τη φορά σε μεγαλύτερο ποσοστό βρίσκεται το BT και ακολουθούν OHBT και MBT. Το ABT, η περισσότερο υδρόφιλη ένωση ($\log K_{ow}=2,00$), δεν ανιχνεύθηκε καθόλου στη σωματιδιακή φάση ενώ αξίζει να σημειωθεί πως η παρουσία του BTCA, της ένωσης δηλαδή που θα χρησιμοποιούνταν σαν εσωτερικό πρότυπο, στη σωματιδιακή φάση είναι αισθητή κατά τη διάρκεια της πρώτης δειγματοληψίας (*Χρωματογράφημα 5.6*).

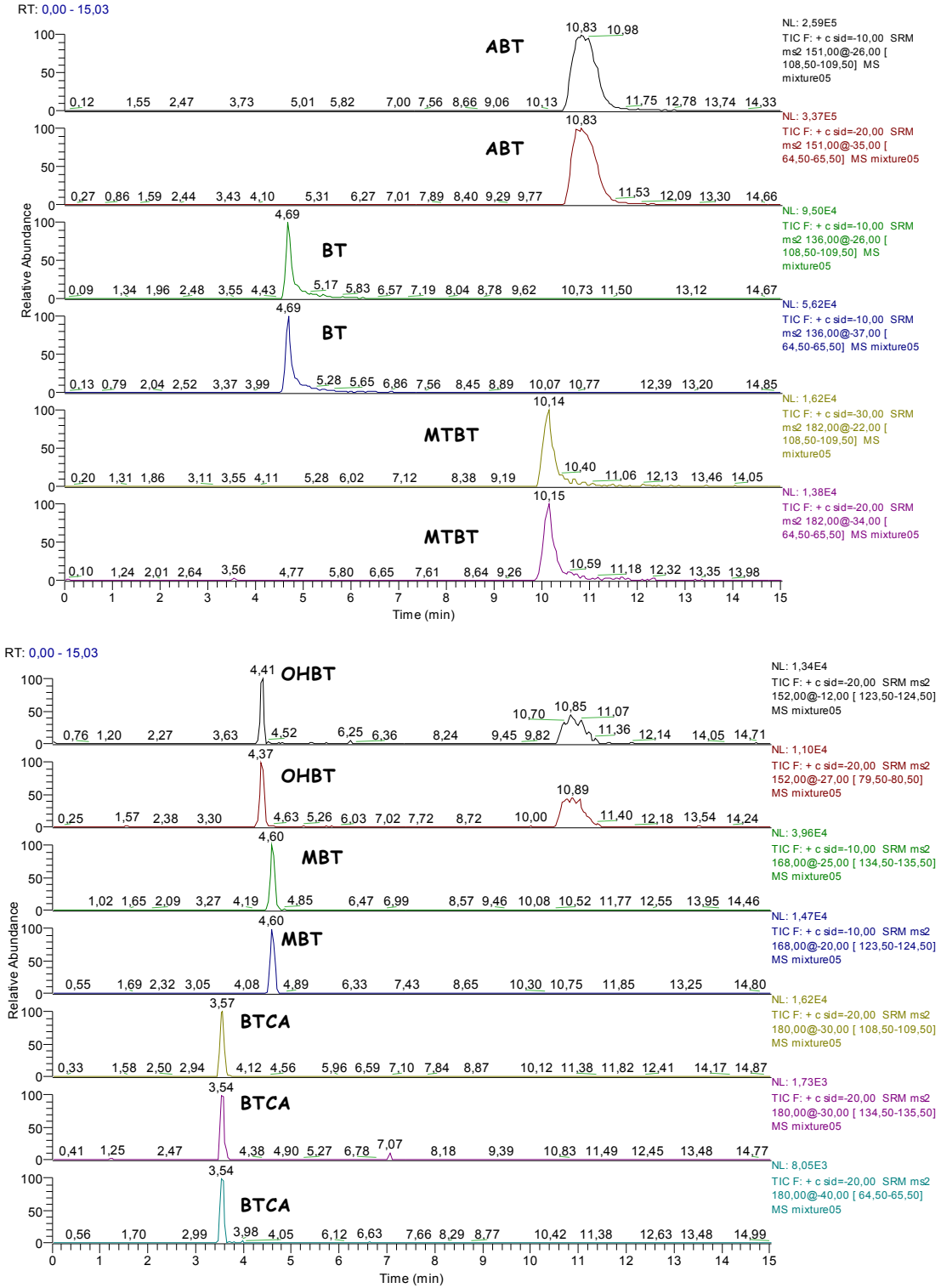
ΕΠΙ ΤΟΙΣ % ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΒΕΝΖΟΘΕΙΑΖΟΛΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
ΕΙΣΡΟΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ
(ΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΗ ΦΑΣΗ)



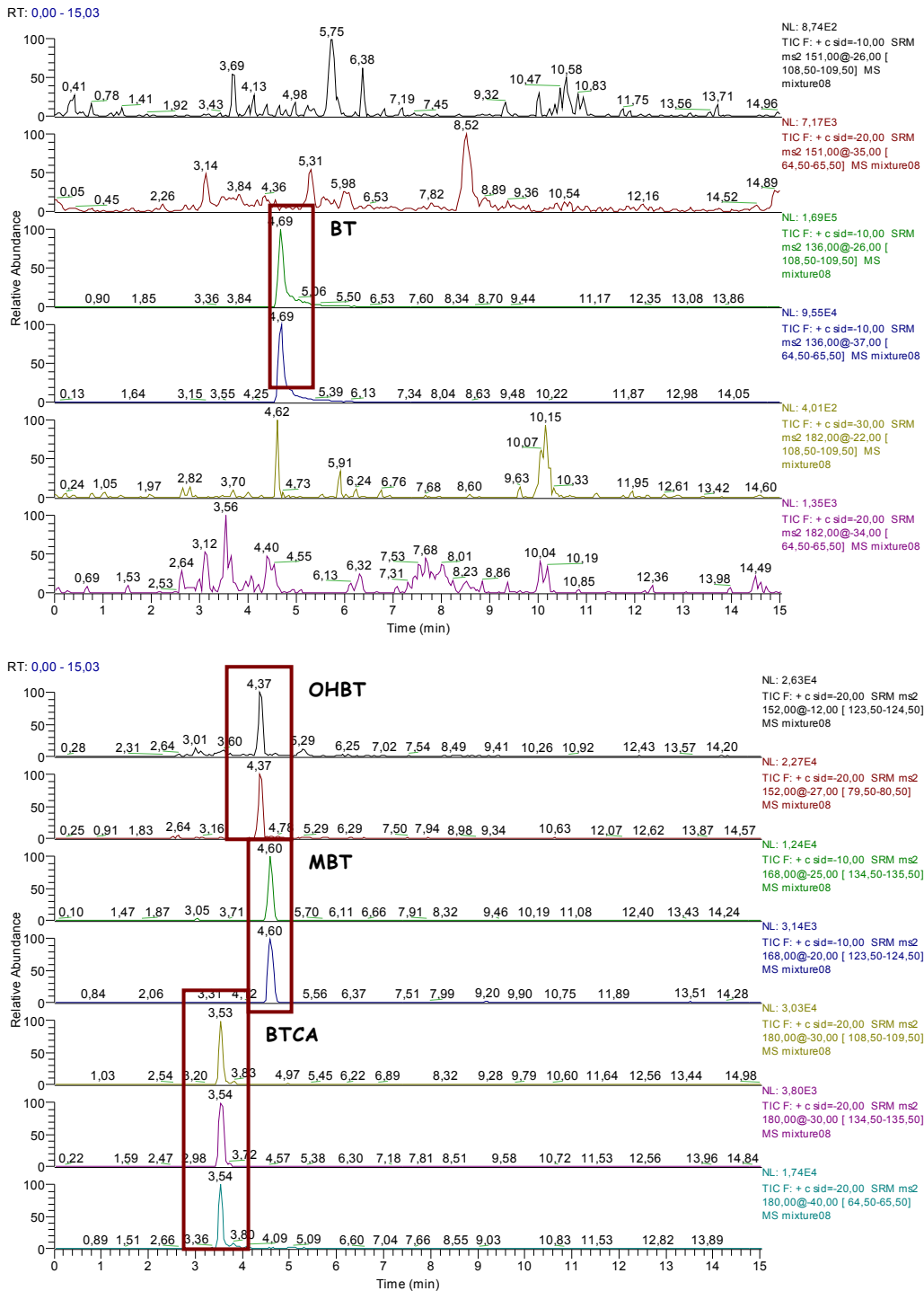
Σχήμα 5.9 : Επί τοις εκατό κατανομή βενζοθειαζολίων στην εισροή του βιολογικού καθαρισμού στις επτά δειγματοληψίες, στη σωματιδιακή φάση.

Στο *Χρωματογράφημα 5.5* παρουσιάζεται ένα πρότυπο δείγμα βενζοθειαζολίων συγκέντρωσης 1ppm, ενώ το *Χρωματογράφημα 5.6* αντιστοιχεί σε ένα δείγμα του

βιολογικού σταθμού επεξεργασίας λυμάτων από το στάδιο εξόδου (σωματιδιακή φάση) κατά την 1^η δειγματοληψία (8.30-14.30).



Χρωματογράφημα 5.5 : Μίγμα προτύπων ουσιών συγκέντρωσης 1ppm



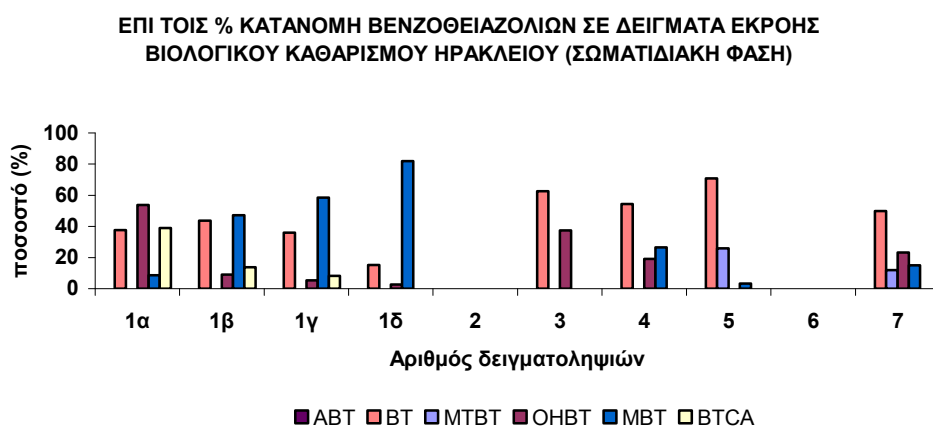
Χρωματογράφημα 5.6 : Δείγμα εξόδου κατά τη 1^η δειγματοληψία, στις 8.30-14.30, σωματιδιακή φάση

Είναι προφανής η ομοιότητα των χρόνων έκλουσης των προτύπων ενώσεων με αυτές που προκύπτουν από το δείγμα στην εκροή του βιολογικού κατά την 1^η δειγματοληψία στη σωματιδιακή φάση (23/01/06, ώρα 8.30-14.30). Η επί τοις εκατό κατανομή

βενζοθειαζολίων στην εκροή του βιολογικού καθαρισμού κατά τη σωματιδιακή φάση παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.10. Αυτή τη φορά το MBT βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στην ημερήσια δειγματοληψία.

Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με το συντελεστή λιποφιλίας του MBT, του οποίου ο $\log K_{ow}=2,86$ και σύμφωνα με τις ιδιότητες των βενζοθειαζολίων είναι η περισσότερο υδρόφοβη ένωση μετά το MTBT το οποίο δεν ανιχνεύθηκε στην εκροή του βιολογικού κατά τη σωματιδιακή φάση. Βέβαια το MTBT που ανιχνεύθηκε στην έξοδο του βιολογικού καθαρισμού κατά τη διαλυτή φάση δεν ανιχνεύεται στη σωματιδιακή, πράγμα το οποίο έρχεται σε αντίθεση με το συντελεστή λιποφιλίας της.

Βέβαια, από μελέτες που έχουν γίνει (Kloepfer, 2005) έχει αποδειχθεί πως η συμπεριφορά μεταξύ του MBT και του MTBT συνδέεται μεταξύ τους. Με την αύξηση του MBT μειώνεται το MTBT, κάτι το οποίο παρατηρείται στη συγκεκριμένη δειγματοληψία. Η μικροβιακή μεθυλίωση των θειολών φαίνεται να μεσολαβεί από μία S-μεθυλοτρανσφεράση και ερμηνεύεται σαν μια στρατηγική μείωσης των τοξικών ιδιοτήτων (Kloepfer, 2005). Η μεθυλίωση του MBT για το σχηματισμό του MTBT παρατηρείται σε εργαστηριακά πειράματα (Reemtsma, 1995) και επίσης αποδείχθηκε ότι η οξεία υδρόβια τοξικότητα του MBT μειώθηκε ουσιαστικά όταν μεθυλιώθηκε σε MTBT (Reemtsma, 1995). Στην Παράγραφο 5.5 παρουσιάζεται η συσχέτιση του MBT με το MTBT βάση δεδομένων από τις δειγματοληψίες του βιολογικού σταθμού Ηρακλείου.

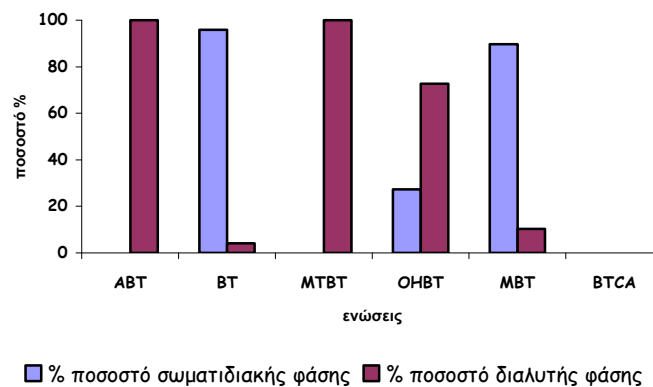


Σχήμα 5.10 : Επί τοις εκατό κατανομή βενζοθειαζολίων στην εκροή του βιολογικού καθαρισμού στις επτά δειγματοληψίες στη σωματιδιακή φάση.

Στην 3^η, 4^η, 5^η και 7^η δειγματοληψία το ΒΤ βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό από τις υπόλοιπες ενώσεις όπως παρατηρείται στο *Σχήμα 5.10* και αυτό πιθανόν να οφείλεται στη διαφορετική προέλευση των δειγμάτων.

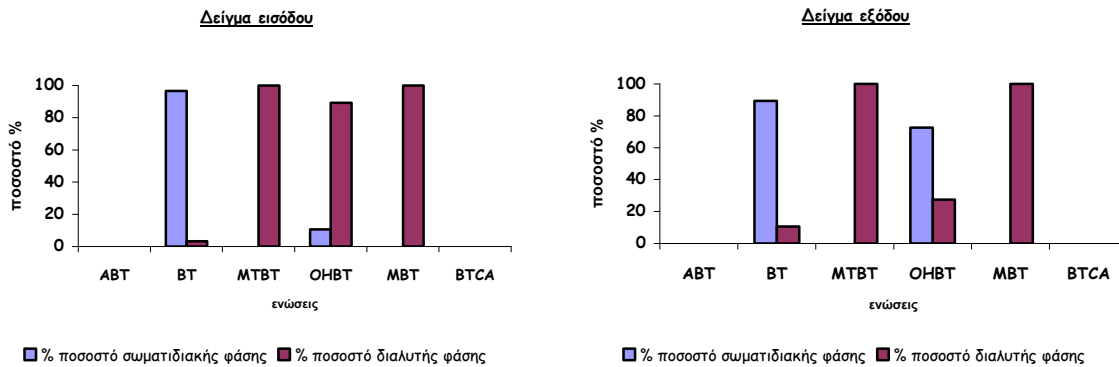
5.4.3 Σύγκριση διαλυτής και σωματιδιακής φάσης σε δείγματα υγρών αποβλήτων

Συγκρίνοντας την επί τοις εκατό κατανομή των βενζοθειαζολίων στη διαλυτή και σωματιδιακή φάση (*Σχήμα 5.11*) κατά τη 2^η δειγματοληψία παρατηρείται πως το ΑΒΤ και το ΜΤΒΤ υπάρχουν μόνο στη διαλυτή φάση. Το ΟΗΒΤ στο μεγαλύτερο ποσοστό του υπάρχει στη διαλυτή φάση ενώ το ΒΤ και το ΜΒΤ παρουσιάζουν μεγαλύτερη αφθονία στη σωματιδιακή φάση.



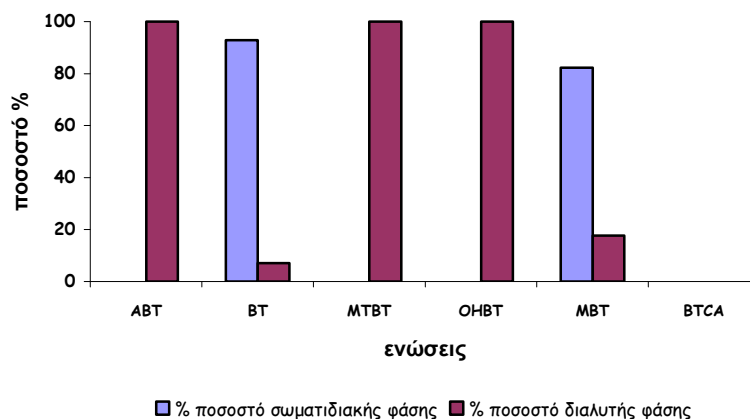
Σχήμα 5.11 : Σύγκριση της επί τοις εκατό κατανομής βενζοθειαζολίων στην εισροή του βιολογικού καθαρισμού στη διαλυτή και σωματιδιακή φάση κατά τη 2^η δειγματοληψία.

Κατά την 3^η δειγματοληψία αν συγκριθεί η επί τοις εκατό κατανομή των βενζοθειαζολίων στη διαλυτή και σωματιδιακή φάση στην είσοδο και στην έξοδο (*Σχήμα 5.12*) παρατηρείται πως το ΟΗΒΤ στο μεγαλύτερο ποσοστό του υπάρχει στη διαλυτή φάση στην εισροή του βιολογικού, ενώ στη σωματιδιακή φάση στην εκροή του βιολογικού. Το ΒΤ παρουσιάζει μεγαλύτερη αφθονία στη σωματιδιακή φάση τόσο στην είσοδο όσο και στην έξοδο. Οι άλλες ενώσεις υπάρχουν μόνο στη διαλυτή φάση τη συγκεκριμένη ημέρα.



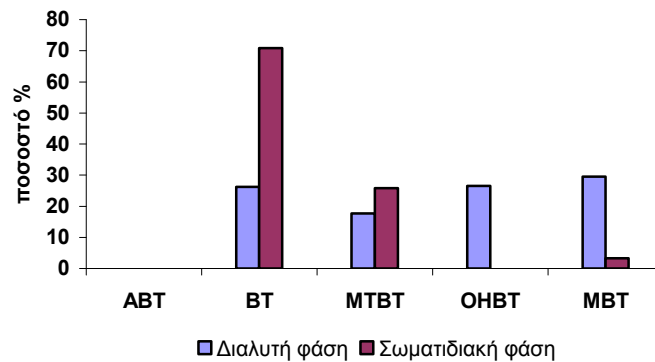
Σχήμα 5.12 : Σύγκριση της επί τοις εκατό κατανομής βενζοθειαζολίων στην εισροή και εκροή του βιολογικού καθαρισμού στην διαλυτή και σωματιδιακή φάση κατά τη 3^η δειγματοληψία.

Στην 4^η δειγματοληψία αν συγκριθούν η επί τοις εκατό κατανομή των βενζοθειαζολίων στη διαλυτή και σωματιδιακή φάση (Σχήμα 5.13) στην εισροή του βιολογικού παρατηρείται πως μόνο το MBT και το BT υπάρχουν και στις δύο αυτές φάσεις και βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα σωματίδια. Οι υπόλοιπες ενώσεις παρουσιάζονται μόνο στη διαλυτή φάση.



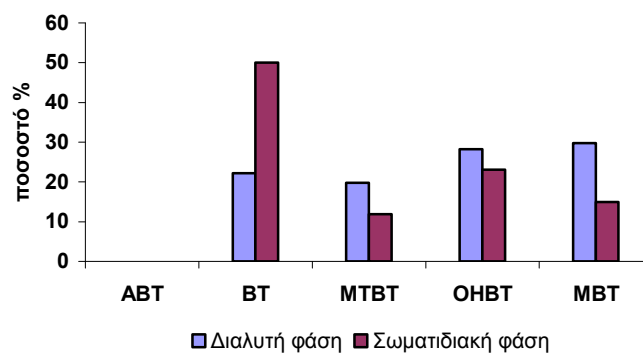
Σχήμα 5.13 : Σύγκριση της επί τοις εκατό κατανομής βενζοθειαζολίων στην εισροή του βιολογικού καθαρισμού στη διαλυτή και σωματιδιακή φάση κατά τη 4^η δειγματοληψία.

Συγκρίνοντας τη διαλυτή με τη σωματιδιακή φάση στην εκροή του βιολογικού καθαρισμού στις 11/09/06 (Σχήμα 5.14) παρατηρείται καταρχήν πως μόνο το OHBT δεν βρέθηκε και στη σωματιδιακή φάση, ενώ το BT βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στη σωματιδιακή φάση καθώς και η επί τοις εκατό κατανομή του είναι σαφώς μεγαλύτερη στα στερεά σωματίδια.



Σχήμα 5.14 : Σύγκριση της επί τοις εκατό κατανομής βενζοθειαζολίων στην εκροή του βιολογικού καθαρισμού στη διαλυτή και σωματιδιακή φάση κατά τη 5^η δειγματοληψία.

Συγκρίνοντας τη διαλυτή με τη σωματιδιακή φάση στην εκροή του βιολογικού καθαρισμού στις 14/09/06 (Σχήμα 5.15) παρατηρείται πως και πάλι το BT βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στη σωματιδιακή φάση καθώς και η επί τοις εκατό κατανομή του είναι σαφώς μεγαλύτερη στα στερεά σωματίδια. Το MTBT, OHBT και MBT υπερτερούν στη διαλυτή φάση.



Σχήμα 5.15 : Σύγκριση της επί τοις εκατό κατανομής βενζοθειαζολίων στην εκροή του βιολογικού καθαρισμού στη διαλυτή και σωματιδιακή φάση κατά τη 7^η δειγματοληψία.

Γενικά, λοιπόν, ενώ αναμενόταν το BT να επιλέγει τη διαλυτή φάση για κάποιο λόγο ανιχνεύεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα σωματίδια. Το φαινόμενο αυτό θα εξηγηθεί στην Παράγραφο 5.6.

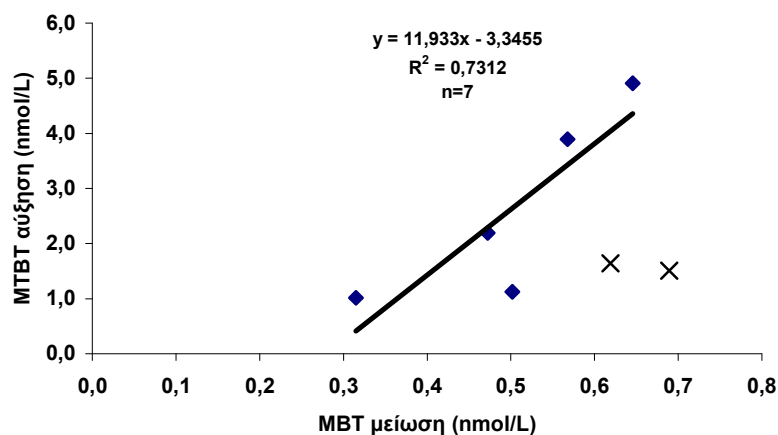
5.5 Συσχέτιση του MBT με το MTBT από δεδομένα βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου

Στον Πίνακα 5.16 παρουσιάζονται κάποια δεδομένα από την εισροή και εκροή του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου για τα MBT και MTBT. Από μελέτες που έχουν γίνει έχει βρεθεί πως αυτές οι δύο ενώσεις συσχετίζονται μεταξύ τους (Klöpper, 2005), πράγμα το οποίο παρατηρήθηκε και στα δείγματα του σταθμού του Ηρακλείου.

Πίνακας 5.16 : Συγκεντρώσεις του MBT και του MTBT στην εισροή και εκροή του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου

	Συγκέντρωση (μg/L)		Συγκέντρωση (nmol/L)	
	MBT	MTBT	MBT	MTBT
εισροή	0,1	0,3	0,6	1,6
	0,1	0,9	0,6	4,9
	0,1	0,4	0,5	2,2
	0,1	0,3	0,7	1,5
	0,1	0,2	0,5	1,1
εκροή	0,1	0,7	0,6	3,9
	0,1	0,2	0,3	1,0

Μια σαφής και στατιστικά σημαντική ($R^2=0,73$) τάση είναι ορατή, δείχνοντας ότι μια αυξανόμενη αφαίρεση του MBT συνοδεύεται από τον αυξανόμενο σχηματισμό του MTBT (Σχήμα 5.16) αφού το MBT μεθυλιώνεται για να σχηματιστεί το MTBT.



Σχήμα 5.16 : Συσχέτιση του MBT με το MTBT. Τα X σημεία είναι εκτός της γραμμικής παλινδρόμησης

5.6 Συσχέτιση των συγκεντρώσεων στη σωματιδιακή και διαλυτή φάση με χρήση ισοθέρμων προσρόφησης

Τα ισόθερμα είναι μοντέλα που περιγράφουν την κατανομή μιας ουσίας στις δύο φάσεις του συστήματος σε κατάσταση ισορροπίας υπό σταθερή πίεση. Λαμβάνοντας υπόψη ότι για να φτάσουν τα οικιακά απόβλητα στην εγκατάσταση του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου απαιτούνται έως και τέσσερις ώρες, μπορεί να θεωρηθεί ότι πρακτικά στα υδατικά απόβλητα που έχουν εισέλθει στη μονάδα επικρατεί ισορροπία (steady state).

Επίσης, η θερμοκρασία 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 μαθηματικών εκφράσεων των ισοθέρμων προκειμένου να γίνει συσχέτιση των ενώσεων μεταξύ σωματιδιακής και υδατικής φάσης.

Στην παρούσα εργασία θα εφαρμοστεί το γραμμικό μοντέλο στα αιωρούμενα στερεά (1), αφού η συγκέντρωση των βενζοθειαζολίων στο διάλυμα είναι μικρή και επομένως ευνοείται η χρήση του γραμμικού μοντέλου σε σχέση με το μοντέλο Freundlich.

$$C_s = K_d \cdot C_w \quad (1)$$

- 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_d : Συντελεστής κατανομής

Στον πίνακα 5.17, με τη βοήθεια των συγκεντρώσεων στα δείγματα εισροής του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου, υπολογίζεται ο συντελεστής K , ο οποίος είναι ένας «δείκτης προσρόφησης», με τρόπο όμοιο του συντελεστή κατανομής K_d του γραμμικού ισοθέρμου.

Πίνακας 5.17 : Προσδιορισμός του δείκτη προσρόφησης K από πειραματικά δεδομένα στην εισροή του βιολογικού καθαρισμού

Εισροή βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου							
a/a	Δειγματοληψίες	Ώρα	Ενώσεις	Διαλυμένα (μg/L)	Προσροφημένα (μg/g)	Kd (1/kg)	logKd
1α		8.30-14.30	BT	0,43	10,68	24573	4,39
			OHBT	1,32	1,39	1053	3,02
1β	23/1/2006	15.30-21.30	BT	0,27	4,65	17066	4,23
			OHBT	1,74	0,48	273	2,44
1γ		22.30-4.30	BT	0,26	8,54	32660	4,51
			OHBT	1,19	0,41	346	2,54
1δ		5.30-7.30	BT	0,11	3,90	36517	4,56
			OHBT	0,47	0,68	1455	3,16
2	1/2/2006	14.30-15.30	BT	0,52	76,25	146805	5,17
			OHBT	1,26	2,93	2331	3,37
			MBT	0,08	4,26	53904	4,73
3	8/2/2006	14.00-15.00	BT	0,34	33,94	99650	5,00
			OHBT	2,18	0,93	426	2,63
4	13/2/2006	14.00-15.00	BT	0,37	26,00	70515	4,85
			MBT	0,08	2,11	25161	4,40

Όπως παρατηρείται από τον Πίνακα 5.17, η ένωση με το μεγαλύτερο συντελεστή προσρόφησης είναι το BT, ακολουθεί το MBT και τέλος το OHBT.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και στην εκροή του βιολογικού καθαρισμού (Πίνακας 5.18) και υπολογίστηκε και πάλι ο συντελεστής προσρόφησης. Το BT και πάλι είναι η ένωση με τον μεγαλύτερο συντελεστή προσρόφησης σε σχέση με τις υπόλοιπες ενώσεις.

Πίνακας 5.18 : Προσδιορισμός του δείκτη προσρόφησης K από πειραματικά δεδομένα στην εκροή του βιολογικού καθαρισμού

Εκροή βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου							
α/α	Δειγματοληψίες	Ώρα	Ενώσεις	Διαλυμένα (μg/L)	Προσροφημένα (μg/g)	Kd (1/kg)	logKd
1α		8.30-14.30	BT	1,18	50,05	42491	4,63
			OHBT	3,92	71,96	18335	4,26
1β	23/1/2006	15.30-21.30	BT	0,22	11,91	54903	4,74
			OHBT	0,74	2,47	3337	3,52
1γ		22.30-4.30	BT	0,13	39,14	302960	5,48
			OHBT	1,37	5,90	4320	3,64
1δ		5.30-7.30	MBT	0,09	63,58	669981	5,83
			BT	0,22	16,48	76593	4,88
3	8/2/2006	14.00-15.00	OHBT	1,45	2,95	2041	3,31
			BT	0,10	4,08	40169	4,60
5	11/9/2006	13.00-14.00	OHBT	0,19	2,42	12623	4,10
			BT	0,66	0,78	1196	3,08
7	14/9/2006	11.00	MTBT	0,44	0,29	648	2,81
			MBT	0,74	0,04	50	1,70
7	14/9/2006	11.00	BT	0,46	0,78	1691	3,23
			MTBT	0,41	0,19	453	2,66
			OHBT	0,59	0,36	615	2,79
			MBT	0,62	0,23	379	2,58

Θέλοντας να συγκρίνουμε τη μέση τιμή για τα logKd έτσι όπως προέκυψαν από τα πειραματικά δεδομένα με τις αντίστοιχες τιμές των δεικτών λιποφιλίας logK_{ow} προκύπτει ο Πίνακας 5.19.

Πίνακας 5.19 : Μέσος όρος του δείκτη προσρόφησης και σύγκρισή του με δείκτη λιποφιλίας

	logKow	logKd	αριθμός δειγμάτων (n)
BT	2,17	4,53±0,66	14
OHBT	2,35	3,23±0,59	12
MBT	2,86	3,20±1,31	4
MTBT	3,22	2,80±0,02	2

Παρατηρείται πως ο μέσος όρος του δείκτη προσρόφησης δεν συμφωνεί με το δείκτη λιποφιλίας. Για παράδειγμα, το βενζοθειαζόλιο, η περισσότερο υδρόφιλη ένωση βάση των πειραματικών δεδομένων προτιμά τη σωματιδιακή φάση από ότι τη διαλυτή.

Αυτό εξηγείται αν λάβουμε υπόψη μας πως τα περισσότερα από τα βενζοθειαζόλια (BT, OHBT, MBT) χρησιμοποιούνται στα ελαστικά. Τα σωματίδια λοιπόν, που παράγονται

από την τριβή των ελαστικών περιέχουν σημαντική ποσότητα βενζοθειαζολίων, ωστόσο το μεγαλύτερο ποσοστό τους αναμένεται να είναι εγκλωβισμένο στο εσωτερικό των σωματιδίων (non-exchangeable) και να μην είναι έτσι διαθέσιμο για διαλυτοποίηση.

Παρότι, λοιπόν, κάποια βενζοθειαζόλια έχουν υψηλή διαλυτότητα στο νερό (2300-4300mg/L, ΟΗΒΤ, ΒΤ αντίστοιχα) και θα αναμενόταν να ανιχνεύονται στη διαλυτή φάση των υδάτων, η μη διαθεσιμότητά τους για διαλυτοποίηση τα έκαναν να ανιχνεύονται και σε μεγάλο ποσοστό στη σωματιδιακή φάση.

Για παράδειγμα, στα δείγματα απορροής δρόμων (Σχήμα 4.1) παρατηρείται πως και το ΒΤ καθώς και το ΜΒΤ βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στη σωματιδιακή φάση γεγονός που αποδεικνύει πως αυτές οι δυο ενώσεις καταλήγουν στο βιολογικό καθαρισμό καθλωμένες στο εσωτερικό των σωματιδίων, άρα δεν μπορούν να διαλυθούν.

IV.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΚΕΦ 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

6.1 Συμπεράσματα που αφορούν στην ανάπτυξη και στην βελτιστοποίηση της αναλυτικής μεθόδου

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μια αναλυτική μέθοδος, η οποία επιτρέπει τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των βενζοθειαζολίων (ABT, BT, MBT, MTBT, OHBT, BTCA). Αυτή η μέθοδος εφαρμόστηκε για την ανάλυση δειγμάτων διαλυτής και σωματιδιακής φάσης τα οποία προέρχονταν τόσο από δείγματα του σταθμού βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων όσο και από νερά απορροής δρόμων, ελαστικά και εμπορικά προϊόντα (calgonit, calgon, αντιψυκτικό αυτοκινήτου). 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 :

- Αναπτύχθηκε μια ιδιαίτερα ευαίσθητη κι επιλεκτική μέθοδος για την ανάλυση των βενζοθειαζολίων, η οποία βασίζεται στη 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 βενζοθειαζολίων σε πολύ μικρές ποσότητες.
- Η πρώτη εικόνα για τη μελέτη των ενώσεων ελήφθη από σύστημα HPLC, χωρίς τη χρήση φασματομετρίας μάζας. 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-ES-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.
- Ο έλεγχος παρεμπόδισης μήτρας συνέβαλλε στον ακριβή προσδιορισμό των βενζοθειαζολίων στα δείγματα τα οποία μελετήθηκαν. Πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος ώστε να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα για την

παρεμπόδιση μήτρας. Τελικά, ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με καμπύλη βαθμονόμησης αφού δεν υπήρχε παρεμπόδιση στα δείγματα του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου.

- 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 τα γυάλινα δοχεία των διαλυτών, γεγονός που οδηγεί στο μη αποδοτικό ηλεκτροψεκασμό των βενζοθειαζολίων.
- Προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες τιμές, στις οποίες θα πρέπει να ρυθμίζονται οι διάφορες λειτουργικές παράμετροι των οργάνων.
- Απαιτούνταν ιδιαίτερη προσοχή κατά τη διέλευση των δειγμάτων από τις μικροστήλες όσον αφορά τις ταχύτητες ροής (κατά την εφαρμογή κενού), μεγαλύτερες των 5ml/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 των μικροστηλών η οποία οδηγεί στην απομόνωση και συμπύκνωσή τους.
- Υπολογίστηκε η ανάκτηση της μεθόδου με ή χωρίς να χρησιμοποιηθεί αναγωγικό αντιδραστήριο και με διαφορετικές ταχύτητες ροής ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες κατά τη διάρκεια της εκχύλισης στερεάς φάσης.
- Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης όχι μόνο για τα δείγματα που βρίσκονταν στη διαλυτή φάση αλλά και στη σωματιδιακή.
- Παράλληλα, μεγάλη προσοχή δόθηκε στο χρόνο φιλτραρίσματος των δειγμάτων του βιολογικού καθαρισμού προκειμένου να απομονωθεί η διαλυτή από τη 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 να λαμβάνει χώρα σε ίσους περίπου χρόνους για διαφορετικά δείγματα ροής.
- Αξιοσημείωτο είναι πως τα βενζοθειαζόλια προσδιορίστηκαν και στις δύο φάσεις (διαλυτή και σωματιδιακή) καθώς επίσης προσδιορίστηκε και η προέλευσή τους

ελέγχοντας δείγματα που από τη βιβλιογραφία γνωρίζαμε πως σε αυτά χρησιμοποιούνταν (π.χ. αντιψυκτικό υγρό, ελαστικά αυτοκινήτου).

- Θέλοντας να κάνουμε μια σύγκριση της τεχνικής, η οποία αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία και των αποτελεσμάτων τα οποία ελήφθησαν με βιβλιογραφικά δεδομένα προκύπτει ο Πίνακας 6.1.

Πίνακας 6.1 : Σύγκριση παρούσας μελέτης με αντίστοιχες εργασίες

	Παρούσα εργασία	Reddy et. al (1997)	Reemtsma (2000)	Kloepfer et.al. (2005)
<i>Μέθοδος</i>	HPLC-ESI-MS/MS	GC-MSD ¹	HPLC-ESI-MS/MS	HPLC-ESI-MS/MS
Αναλυτική τεχνική	<i>Ενώσεις</i>	ABT, BT, MBT, MTBT, OHBT, BTCA (θετικός ιονισμός)	OHBT, BT, 24MoBT	BT, ABT, MTBT(θετικός ιονισμός)
	<i>Έκλουση</i>	ισοκρατική		BT, ABT, MeBT, TCMTBT, MTBT(θετικός ιονισμός)
	<i>Έλεγχος παρεμπόδισης μήτρας</i>	αρνητικό αποτέλεσμα (καμπύλη βαθμονόμησης)	Δεν ελέγχθηκε (χρήση καμπύλη βαθμονόμησης)	BTSA, MBT, OHBT (αρνητικός ιονισμός)
	<i>Έλεγχος διαλυτής και σωματιδιακής φάσης</i>	✓		BTSA, MBT, OHBT (αρνητικός ιονισμός)
	<i>εισροή αστικού βιολογικού καθαρισμού</i>	✓		βαθμιδωτή
Περιβαλλοντικά δείγματα	<i>εκροή αστικού βιολογικού καθαρισμού</i>	✓		βαθμιδωτή
	<i>βυρσοδεψεία</i>			Εξωτερική καμπύλη βαθμονόμησης
	<i>νερά απορροής δρόμων</i>	✓		Εξωτερική καμπύλη βαθμονόμησης
	<i>ελαστικά αυτοκινήτου</i>	✓	✓	
	<i>αντιψυκτικό αυτοκινήτου</i>	✓	✓	
	<i>calgon</i>	✓		
	<i>calgonit</i>	✓		
	<i>Έλεγχος προσρόφησης βενζοθειαζολίων στη σωματιδιακή φάση</i>	✓		

¹ : Σύστημα αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματογράφο μάζας

✓ : Πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των υπό μελέτη ενώσεων

Όπως προκύπτει από τον *Πίνακα 6.1* αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία μια αναλυτική μέθοδος για τον έλεγχο πλήθους περιβαλλοντικών δειγμάτων για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ABT, BT, MBT, MTBT, OHBT και BTCA. Το BTCA θα χρησιμοποιούνταν ως εσωτερικό πρότυπο όμως ανιχνεύθηκε σε δείγματα εισροής και εκροής του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου στη σωματιδιακή φάση, οπότε δεν μπορούσε να χρησιμοποιηθεί.

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος παρεμποδίσεων μήτρας, έγινε στατιστική ανάλυση πράγμα το οποίο δεν συμβαίνει σε άλλες εργασίες. Επίσης είναι η μοναδική εργασία που ελέγχει τα δείγματα στη διαλυτή και σωματιδιακή φάση και υπολογίζονται οι συντελεστές προσρόφησης. Ακόμη, στη συγκεκριμένη εργασία εκτός από τα δείγματα βιολογικού καθαρισμού που αναλύθηκαν, αναλύθηκαν και νερά απορροής δρόμων, ελαστικά, αντιψυκτικό αυτοκινήτου κάτι το οποίο δεν πραγματοποιήθηκε συλλογικά σε καμία από τις εργασίες που παρουσιάζονται στον *Πίνακα 6.1*. Μόνο ο Reddy ανέλυσε ελαστικά και αντιψυκτικά αλλά μεμονωμένα για τις ενώσεις BT και OHBT χωρίς βέβαια να λάβει δείγματα από κάποιο βιολογικό σταθμό.

Επιπρόσθετα, στην παρούσα εργασία εκτός από την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της αναλυτικής τεχνικής για τον προσδιορισμό βενζοθειαζολίων σε δείγματα αποβλήτων, σε ελαστικά, νερά δρόμων και αντιψυκτικά υγρά, για πρώτη φορά οι ενώσεις αυτές ανιχνεύθηκαν σε εμπορικά προϊόντα (calgon, calgonit), συνεπώς είναι δυνατό να συμπεράνουμε από ποια πηγή τα βενζοθειαζόλια καταλήγουν στο βιολογικό καθαρισμό.

6.2 Συμπεράσματα τα οποία προέκυψαν από τη μελέτη περιβαλλοντικών δειγμάτων

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

- Οι προς ανάλυση ενώσεις προσδιορίζονται σε επίπεδα της τάξης μεγέθους $\mu\text{g/L}$ για τη διαλυτή φάση και $\mu\text{g/g}$ για τη σωματιδιακή φάση.
- Από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των βενζοθειαζολίων σε υδατικά συστήματα προκύπτει ο *Πίνακας 6.2*.

Πίνακας 6.2 : Ποσοτικός προσδιορισμός βενζοθειαζολίων που πραγματοποιήθηκε σε άλλες μελέτες

Ενώσεις	Reddy et. al. (1997)		Kloepfer et. al (2005)			Reemtsma (2000)
	λάστιχα	Αντιψυκτικό αυτοκινήτου	Εισροή βιολ.καθαρισμού (διαλυτή φάση)	Εκροή βιολ.καθαρισμού (διαλυτή φάση)	Νερά απορροής (διαλυτή φάση)	Εκροή από βυρσοδεψείο (διαλυτή φάση)
	ppm		μg/L			μg/L
ABT						0,39
BT	171,00	7,51	0,74-0,85	0,07-2,26	0,1-0,5	7,5
MTBT			0,17-0,44	0,36-0,55	0,04-0,2	3,5
OHBT	80,90	7,23			5,00-7,00	3,9
MBT						1,1

Στον Πίνακα 6.3 παρατίθενται συνοπτικά τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των βενζοθειαζολίων της παρούσας εργασίας στη διαλυτή φάση.

Πίνακας 6.3 : Ποσοτικός προσδιορισμός βενζοθειαζολίων στην παρούσα μελέτη

Ενώσεις	παρούσα εργασία							
	σαμπρέλα	ελαστικό αυτοκινήτου	calgon	calgonit	Νερά απορροής (διαλυτή φάση)	Αντιψυκτικό αυτοκινήτου	Εισροή βιολ.καθαρισμού (διαλυτή φάση)	Εκροή βιολ.καθαρισμού (διαλυτή φάση)
	μg/g				μg/l			
ABT	0,08	0,05	Δ.Α.	0,01	0,03-0,1	2,95	0,03-0,07	0,01
BT	7,22	44,87	0,01	0,09	1,91-2,55	3,77	0,11-0,75	0,1-1,18
MTBT	0,24	0,67	Δ.Α.	0,57	Δ.Α.	Δ.Α.	0,20-0,68	0,18-0,71
OHBT	27,68	40,74	0,01	0,01	Δ.Α.	Δ.Α.	0,44-2,18	0,19-3,92
MBT	0,05	0,12	0,47	Δ.Α.	3,27-4,28	157,97	0,08-0,85	0,05-0,74
Άθροισμα	35,27	86,45	0,50	0,68				

Παρατηρείται, καταρχήν, πως οι συγκεντρώσεις βενζοθειαζολίων σε λάστιχα και σε αντιψυκτικό αυτοκινήτου στην εργασία του Reddy (Reddy, 1997) είναι κατά πολύ μεγαλύτερες από ότι στην παρούσα εργασία. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι τα αντιψυκτικά υγρά που αναλύθηκαν από την ομάδα του Reddy είχαν ήδη χρησιμοποιηθεί στα αυτοκίνητα σε αντίθεση με την εργασία αυτή που το αντιψυκτικό αυτοκινήτου δεν είχε χρησιμοποιηθεί.

Στην απορροή δρόμων τα MTBT και OHBT δεν βρέθηκαν στην παρούσα εργασία. Αντίθετα, ο Kloepfer ανίχνευσε και τις δυο αυτές ενώσεις. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην μεγαλύτερη κυκλοφορία που μπορεί να είχε ο συγκεκριμένος δρόμος σε σχέση με το δρόμο της Χερσονήσου καθώς επίσης και στο είδος των ελαστικών που χρησιμοποιούνται σε κάθε χώρα. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν στην εργασία του

Kloerfer προέρχονταν από ένα κεντρικό αυτοκινητόδρομο του Βερολίνου όπου περίπου 200.000 αυτοκίνητα διασχίζουν τον αυτοκινητόδρομο καθημερινά πράγμα το οποίο δεν συμβαίνει στο δρόμο που πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες στην παρούσα εργασία συνεπώς είναι αναμενόμενο να υπάρχουν διαφοροποιήσεις στα αποτελέσματα.

- Επίσης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, η αναλογία των ενώσεων που προσδιορίστηκαν δεν μπορεί να μας δώσει ακριβείς πληροφορίες για την τελική προέλευση των ενώσεων αυτών στα λύματα καθώς είναι πολύ πιθανόν να υπάρχουν διάφορες πηγές από όπου προέρχονται τα βενζοθειαζόλια και απλώς ο χώρος της βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων δρα σαν αποδέκτης.
- Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα που προκύπτουν κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των βενζοθειαζολίων στα δείγματα του βιολογικού σταθμού Ηρακλείου προκύπτει πως η κατανομή των υπό μελέτη ενώσεων στα δείγματα εισροής και εκροής του σταθμού παρουσιάζουν μια συσχέτιση ανά συγκεκριμένες ημερομηνίες. Για παράδειγμα, η επί τοις % κατανομή των βενζοθειαζολίων σε δείγματα εισροής του βιολογικού καθαρισμού παρουσιάζει όμοιο προφίλ κατά τη διάρκεια της ημερήσιας δειγματοληψίας (Σχήμα 5.7). Αυτό βέβαια δεν ισχύει αν συγκριθεί η επί τοις % κατανομή συνολικά, αφού για παράδειγμα τα βενζοθειαζόλια παρουσιάζουν διαφορετικό προφίλ στις τρεις τελευταίες δειγματοληψίες (Σχήμα 5.7). Θα πρέπει, βέβαια, να επισημανθεί, πως τα δείγματα τα οποία ελήφθησαν από το σταθμό 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 σε αυτά.
- Επιπλέον, όπως έχει ήδη αναφερθεί, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός και στη σωματιδιακή φάση. Σ' αυτή, ανιχνεύθηκε στην ημερήσια δειγματοληψία και το BTCA, ένωση η οποία σε άλλες εργασίες χρησιμοποιείται σαν εσωτερικό πρότυπο. Αυτό μαρτυρεί πως η ένωση αυτή δεν υπάρχει σε υδατικά δείγματα σε αντίθεση με τα δείγματα του βιολογικού σταθμού Ηρακλείου. Η παραπάνω διαφορά μπορεί να αποδοθεί σε διαφορετική διαχείριση των λυμάτων από περιοχή σε περιοχή. Για παράδειγμα ο σταθμός Ηρακλείου δέχεται απόβλητα ακόμη και από φανοποιεία και βενζινάδικα πράγμα το οποίο δεν γνωρίζουμε αν συμβαίνει σε άλλες χώρες.

Αφού, λοιπόν, προσδιορίστηκαν τα βενζοθειαζόλια στη σωματιδιακή φάση, υπολογίστηκε ο συντελεστής προσρόφησης της κάθε ένωσης. Παρατηρήθηκε πως η τιμή $\log K_{ow}$ και $\log K_{od}$ της κάθε ένωσης δεν έρχεται σε συμφωνία. Η εξήγηση που δόθηκε για αυτό είναι πως τα σωματίδια που παράγονται από την τριβή των ελαστικών περιέχουν σημαντική ποσότητα βενζοθειαζολίων, ωστόσο το μεγαλύτερο ποσοστό τους αναμένεται να είναι εγκλωβισμένο στο εσωτερικό των σωματιδίων (non-exchangeable) και να μην είναι έτσι διαθέσιμο για διαλυτοποίηση. Αυτή η άποψη ενισχύεται αν συγκρίνουμε τη διαλυτή και τη σωματιδιακή φάση για το BT στα δείγματα απορροής δρόμων. Πριν ακόμη λοιπόν, το BT καταλήξει στο βιολογικό καθαρισμό ήδη είναι εγκλωβισμένο στη σωματιδιακή φάση (Συγκέντρωση BT στη σωματιδιακή φάση 3,44 $\mu\text{g/L}$, ενώ στη διαλυτή φάση 2,55 $\mu\text{g/L}$).

BIBLIOΓΡΑΦΙΑ

1. Andreozzi R., Caprio V. and Marotta R. (2001). "Oxidation of benzothiazole, 2-mercaptobenzothiazole and 2- hydroxybenzothiazole in aqueous solution by means of H₂O₂/UV or photoassisted Fenton systems." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **76**(2): 196-202.
2. Azizian M. F., Nelson P. O., Thayumanavan P. and Williamson K. J. (2003). "Environmental impact of highway construction and repair materials on surface and ground waters: Case study: crumb rubber asphalt concrete." Waste Management **23**(8): 719-728.
3. Bellavia V., Natangelo M., Fanelli R. and Rotilio D. (2000). "Analysis of benzothiazole in Italian wines using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry." Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**(4): 1239-1242.
4. BG Chemie (2000). "Kurzfassung toxikologische bewertungen : 2-mercaptobenzothiazol."Nr.70 Ausgabe 11/2000.
5. Brownlee B. G., Carey J. H., MacInnis G. A. & Pellizzari I. T. (1992). "Aquatic Environmental Chemistry of 2-(Thiocyanomethylthio)Benzothiazole and Related Benzothiazoles." Environmental Toxicology and Chemistry **11**(8): 1153-1168.
6. BUA (1991). 2-Mercaptobenzothiazol. Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Frankfurt/Germany. 183pp.
7. Cole, R. B. (1997). *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, New York.
8. De Wever H., Besse P. and Verachtert H. (2001). "Microbial transformations of 2-substituted benzothiazoles." Applied Microbiology and Biotechnology **57**(5-6): 620-625.
9. De Wever H. and Verachtert H. (1997). "Biodegradation and toxicity of benzothiazoles." Water Research **31**(11): 2673-2684.

10. Dean, J.R. (1998). *Extraction Methods for Environmental Analysis*. John Wiley & Sons, New York.
11. Fiehn O., Reemtsma T. and Jekel M. (1994). "Extraction and Analysis of Various Benzothiazoles from Industrial Waste-Water." *Analytica Chimica Acta* **295**(3): 297-305.
12. Fiehn O., Wegener G., Jochimsen J. and Jekel M. (1998). "Analysis of the ozonation of 2-Mercaptobenzothiazole in water and tannery wastewater using sum parameters, liquid-and gas chromatography and capillary electrophoresis." *Water Research* **32**(4): 1075-1084.
13. Flamini R., Panighel A. (2005). "Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part II : The consumer protection." John Wiley & Sons, New York.
14. Gadd J. and Kennedy P. (2003). "Preliminary examination of organic compounds present in tyres, brake pads and road bitumen in New Zealand"
15. Gaja M. A. and Knapp J. S. (1997). "The microbial degradation of benzothiazoles." *Journal of Applied Microbiology* **83**(3): 327-334.
16. Gaskell S. J. (1997). "Electrospray: Principles and practice." *Journal of Mass Spectrometry* **32**(7): 677-688.
17. Geib S., Einax J. W. (2001) Comparison of detection limits in environmental analysis – is it possible? An approach on quality assurance in the lower working range by verification. *Analytical Chemistry* **370** : 673-678
18. Haroune N., Combourieu B., Besse P., Sancelme M., Kloepfer A., Reemtsma T., De Wever H. and Delort A. M. (2004). "Metabolism of 2-mercaptobenzothiazole by *Rhodococcus rhodochrous*." *Applied and Environmental Microbiology* **70**(10): 6315-6319.
19. Haroune N., Combourieu B., Besse P., Sancelme M., Reemtsma T., Kloepfer A., Diab A., Knapp J. S., Baumberg S. and Delort A. M. (2002). "Benzothiazole

- degradation by *Rhodococcus pyridinovorans* strain PA: Evidence of a catechol 1,2-dioxygenase activity." *Applied and Environmental Microbiology* **68**(12): 6114-6120.
- 20.** Καργάκη Σ. (2006). "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, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- 21.** Kellner, R., Mermet, J.M., Otto, M., Widmer, H.M. (1998) *Analytical Chemistry*. John Wiley&Sons, Inc. New York : 186.
- 22.** Κιόχος, Π., Α. (1998) *Επαγωγική Στατιστική*. Εκδοτικός οίκος INTERBOOKS, Αθήνα.
- 23.** Kirouani-Harani H. (2003). "Microbial and photolytic degradation of benzothiazoles in water and wastewater" doctoral, University Berlin
- 24.** Klöpfer A. (2005). "Analyse von Benzothiazolen und Untersuchungen zu deren Auftreten und mikrobiellem Abbau in aquatischen Proben". Diplom-Lebensmittelchemiker
- 25.** Kloepfer A., Jekel M. and Reemtsma T. (2004). "Determination of benzothiazoles from complex aqueous samples by liquid chromatography-mass spectrometry following solid-phase extraction." *Journal of Chromatography A* **1058**(1-2): 81-88.
- 26.** Kloepfer A., Jekel M. and Reemtsma T. (2005). "Occurrence, sources, and fate of benzothiazoles in municipal wastewater treatment plants." *Environmental Science & Technology* **39**(10): 3792-3798.
- 27.** Kumata H., Yamada J., Masuda K., Takada H., Sato Y., Sakurai T. and Fujiwara K. (2002). "Benzothiazolamines as tire-derived molecular markers: Sorptive behavior in street runoff and application to source apportioning." *Environmental Science & Technology* **36**(4): 702-708.
- 28.** Λυμπεράτος Γ. (1999). "Μηχανική Υγρών Αποβλήτων." Εκδόσεις Πανεπιστημίου Πατρών, Πάτρα.

29. Malouki M. A., Richard C. and Zertal A. (2004). "Photolysis of 2-mercaptobenzothiazole in aqueous medium - Laboratory and field experiments." Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry **167**(2-3): 121-126.
30. Merck KGaA, Darmstadt, Germany (2005). ChemDat online, <http://de.chemdat.info/mda/de/>.
31. Morabito R. (1995). "Extraction Techniques in Speciation Analysis of Environmental-Samples." Fresenius Journal of Analytical Chemistry **351**(4-5): 378-385
32. Niessen W. M. A., McCarney C. C., Moulton P. E. G., Tjaden U. R. and Vandergreef J. (1993). "Liquid-Chromatography Mass-Spectrometry for the Identification of Minor Components in Benzothiazole Derivatives." Journal of Chromatography **647**(1): 107-119.
33. Nischwitz V. and Pergantis S. A. (2005). "Liquid chromatography online with selected reaction monitoring electrospray mass spectrometry for the determination of organoarsenic species in crude extracts of marine reference materials." Analytical Chemistry **77**(17): 5551-5563.
34. Platford R. F. (1983). The Octanol-Water Partitioning of Some Hydrophobic and Hydrophilic Compounds. Chemosphere **12**(7-8): 1107-1111.
35. Quintana J. B., Weiss S. and Reemtsma T. (2005). "Pathway's and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor." Water Research **39**(12): 2654-2664.
36. Reddy C. M. and Quinn J. G. (1997). "Environmental chemistry of benzothiazoles derived from rubber." Environmental Science & Technology **31**(10): 2847-2853.
37. Reemtsma T. (2000). Determination of 2-substituted benzothiazoles of industrial use from water by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry **14**(17): 1612-1618.

38. Reemtsma T. (2001). "Prospects of toxicity-directed wastewater analysis." Analytica Chimica Acta **426**(2): 279-287.
39. Reemtsma T., Fiehn O., Kalnowski G. and Jekel M. (1995). "Microbial Transformations and Biological Effects of Fungicide- Derived Benzothiazoles Determined in Industrial Waste-Water." Environmental Science & Technology **29**(2): 478-485.
40. Reemtsma T., Putschew A. and Jekel M. (1999). "Industrial wastewater analysis: a toxicity-directed approach." Waste Management **19**(2): 181-188.
41. Reemtsma T., Zywicki B., Stueber M., Kloepfer A. and Jekel M. (2002). "Removal of sulfur-organic polar micropollutants in a membrane bioreactor treating industrial wastewater." Environmental Science & Technology **36**(5): 1102-1106.
42. Singh, R., Farmer, P.B. (2006) Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection, *Carcinogenesis* 27, p. 178-196
43. Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. (2002). Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης. Εκδόσεις Κωσταράκης, Αθήνα.
44. Snyder, L. R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L. (1997) Practical HPLC Method Development. John Wiley & Sons, Inc. 2nd Ed. New York. pp. 234-237.
45. Stephanou E.G. (2004). Introduction to Modern Mass Spectrometry. Environmental Analytical Chemistry Course.
46. Στεφάνου Ε. Γ. (2006). "Χημεία Περιβάλλοντος Ι : Υδατική Χημεία" , σημειώσεις μεταπτυχιακού μαθήματος στην Υδατική Χημεία, Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Χημικών Διεργασιών.
47. Storm T., Hartig C., Reemtsma T. and Jekel M. (2001). "Exact mass measurements on-line with high-performance liquid chromatography on a quadrupole mass spectrometer." Analytical Chemistry **73**(3): 589-595.

48. Supelco, 1998, Bulletin 910, Guide to solid phase extraction
49. **Syracuse Research Corporation** (2005). Physical Properties Database (PHYSPROP), <http://www.syrres.com/esc/physprop.htm>.
50. Thermo Finnigan Training Institute, TSQ Quantum Operators Course
51. Thurman, E.M., Mills, M.S.(1998). Solid – Phase Extraction Principles and Practice. John Wiley & Sons, New York.
52. Weiss S. and Reemtsma T. (2005). "Determination of benzotriazole corrosion inhibitors from aqueous environmental samples by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry." Analytical Chemistry **77**(22): 7415-7420.
53. Welch D.I.,Watts C.D. (1990) "Collection and identification of trace organic compounds in atmospheric deposition from a semi rural site in the UK. Intern." Environ. Anal. Chem. **38**:185-198.
54. Ζανάκη Κ., (2001). Έλεγχος ποιότητας νερού. Εκδόσεις Ιών, Αθήνα.

Web sites

- <http://www.deyah.gr/biologic.htm>
- <http://en.wikipedia.org/>
- hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book
- <http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/>
- http://www.env.uoi.gr/web_lessons

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

1. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

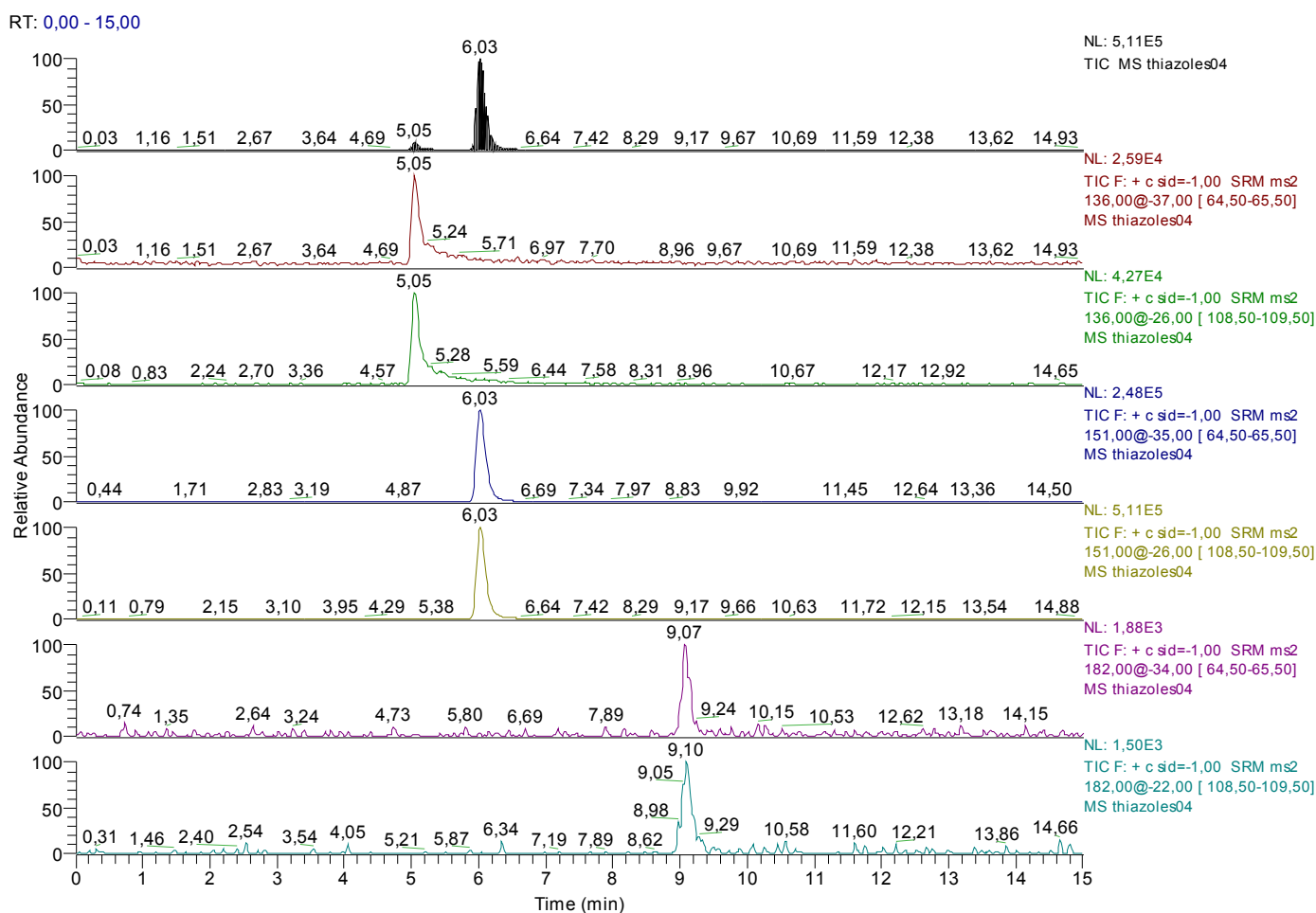
Α. Χρωματογραφήματα για τη βέλτιστη ενέργεια πρόσκρουσης και το βέλτιστο εφαρμοζόμενο δυναμικό

Συνθήκες οργάνου :

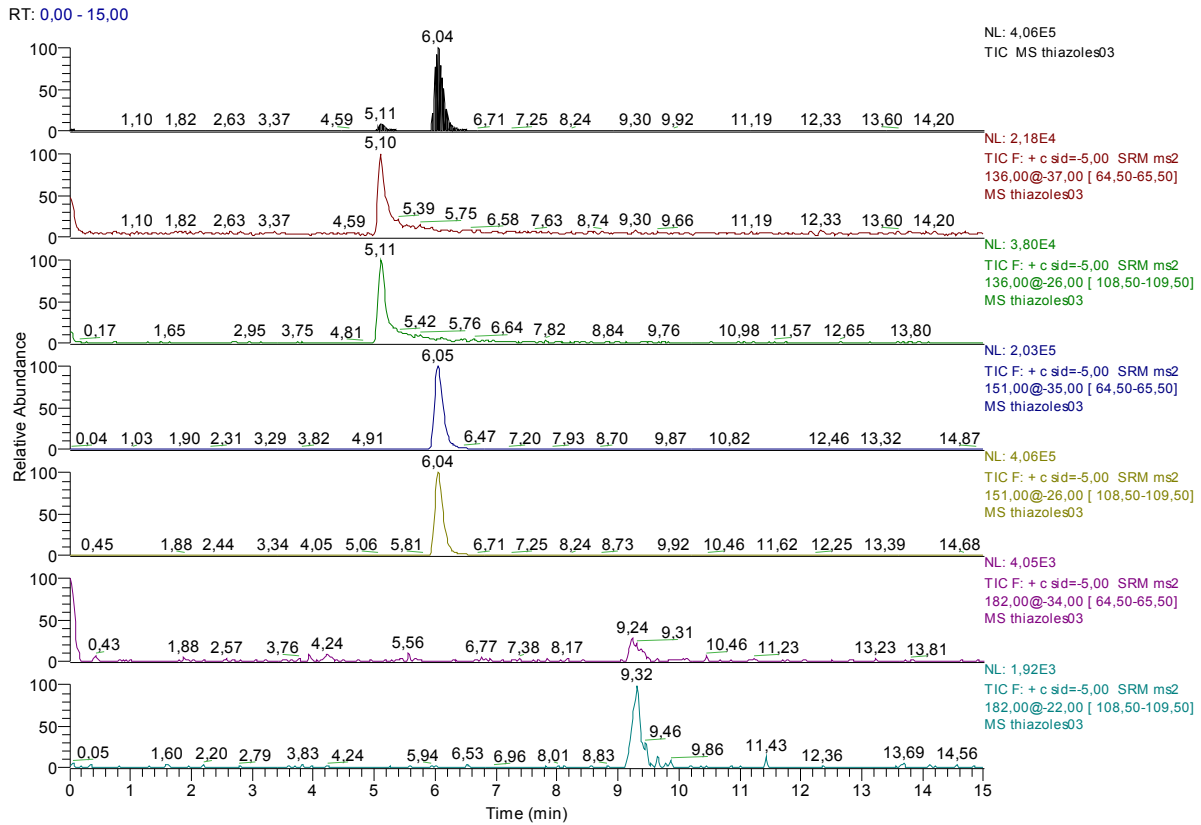
Στήλη : Hypersil BDS C8, 5μ, 250X4,6 mm

Ροή : 1000μl/min

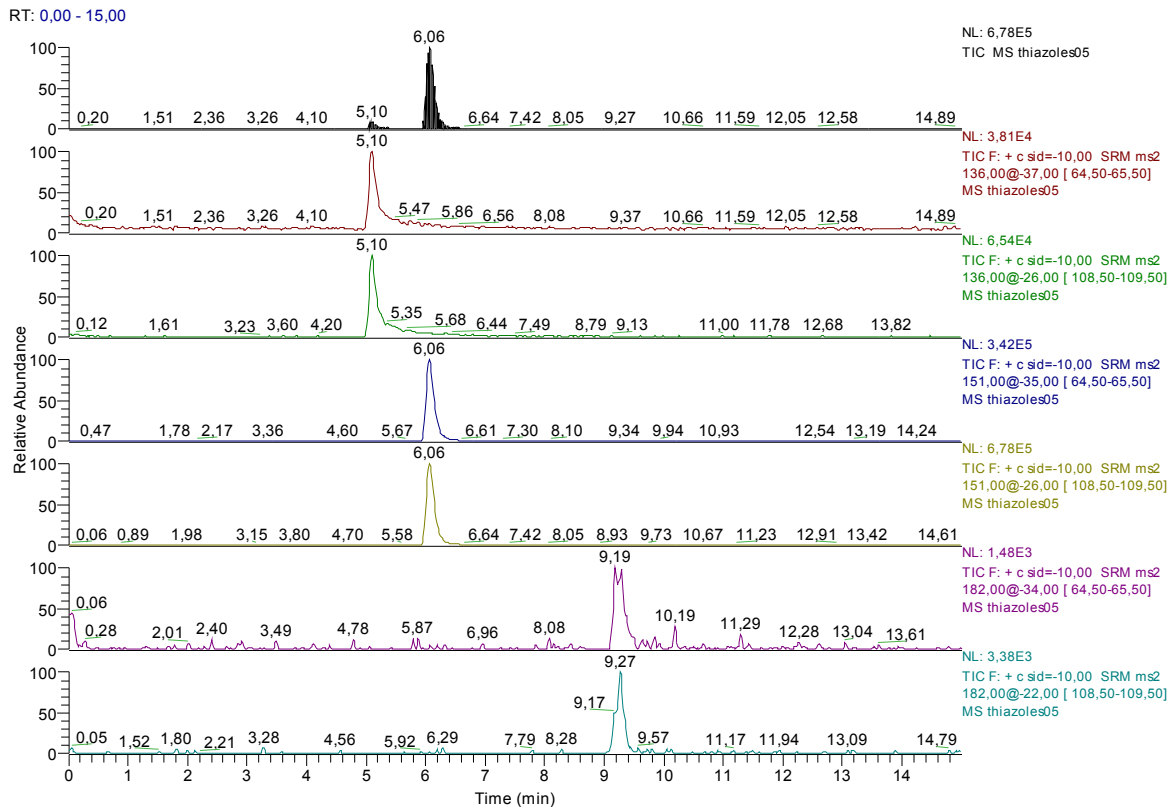
Κινητή φάση : μεθανόλη/υπερκάθαρο νερό 52/48 και 0,1% φορμικό οξύ



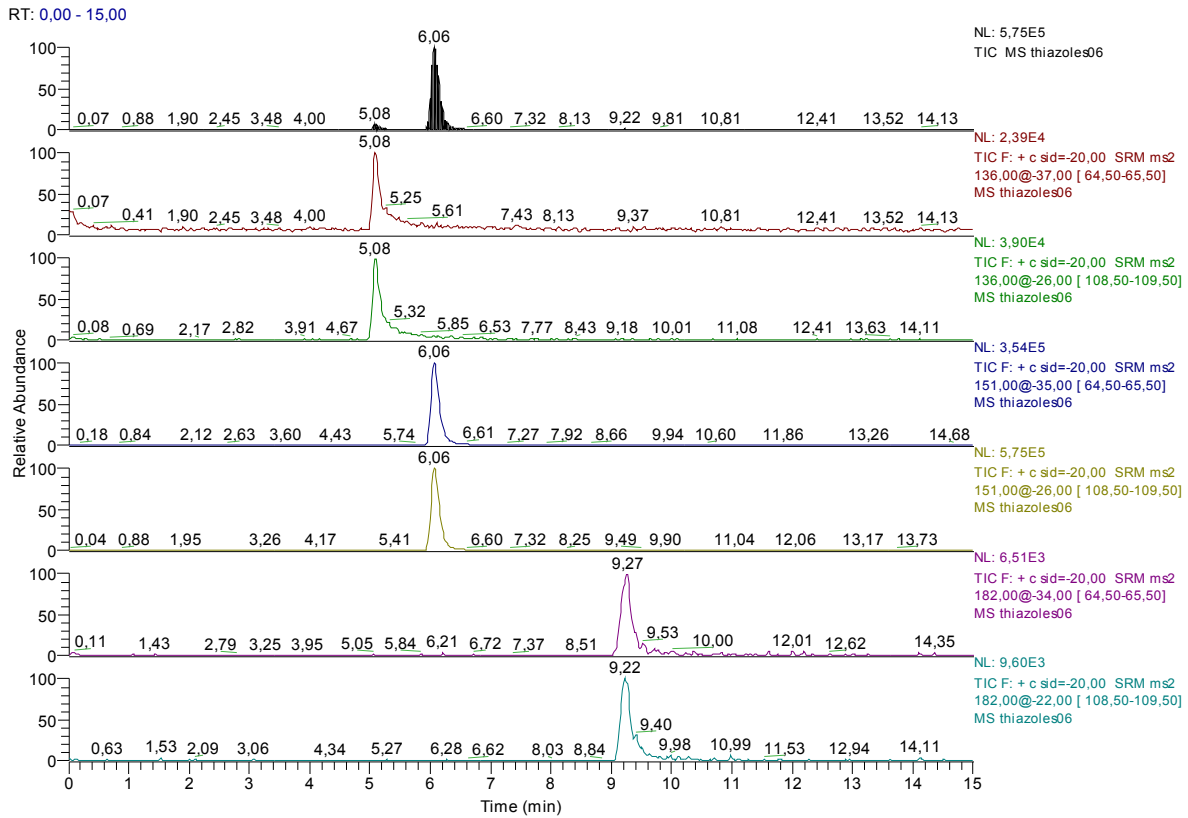
Χρωματογράφημα 1A-1 : Πρότυπο διάλυμα ΒΤ, ΑΒΤ, ΜΤΒΤ 250ppb με ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή 1eV και αυτόματο εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού.



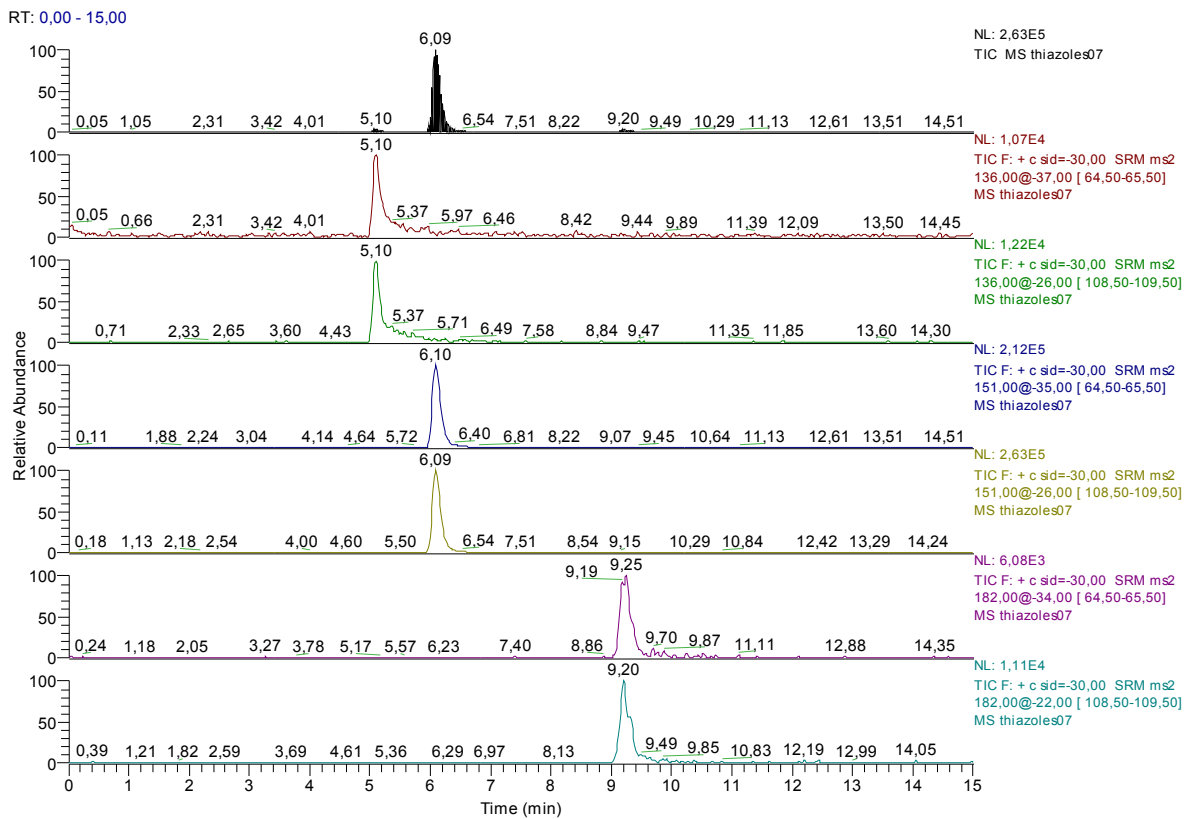
Χρωματογράφημα 1A-2 : Πρότυπο διάλυμα ΒΤ, ΑΒΤ, ΜΤΒΤ 250ppb με ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή 5eV και αυτόματο εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού.



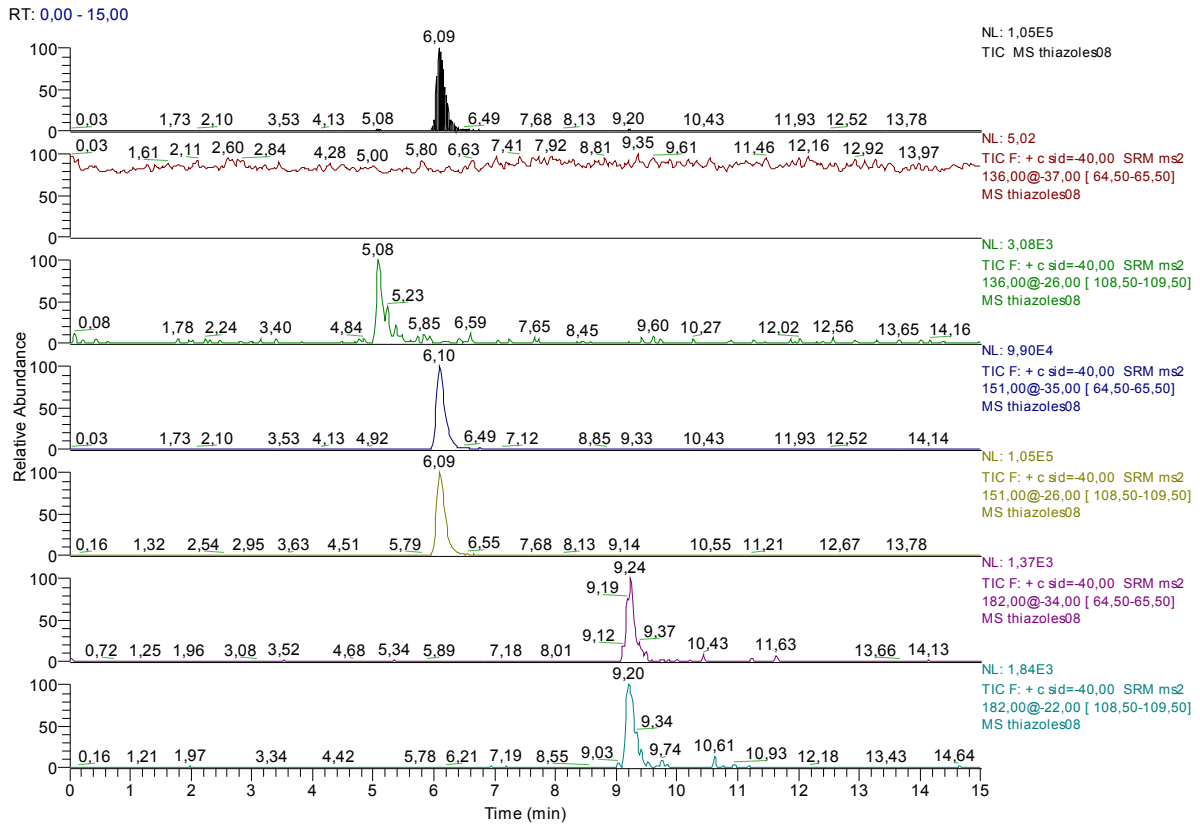
Χρωματογράφημα 1A-3 : Πρότυπο διάλυμα ΒΤ, ΑΒΤ, ΜΤΒΤ 250ppb με ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή 10eV και αυτόματο εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού.



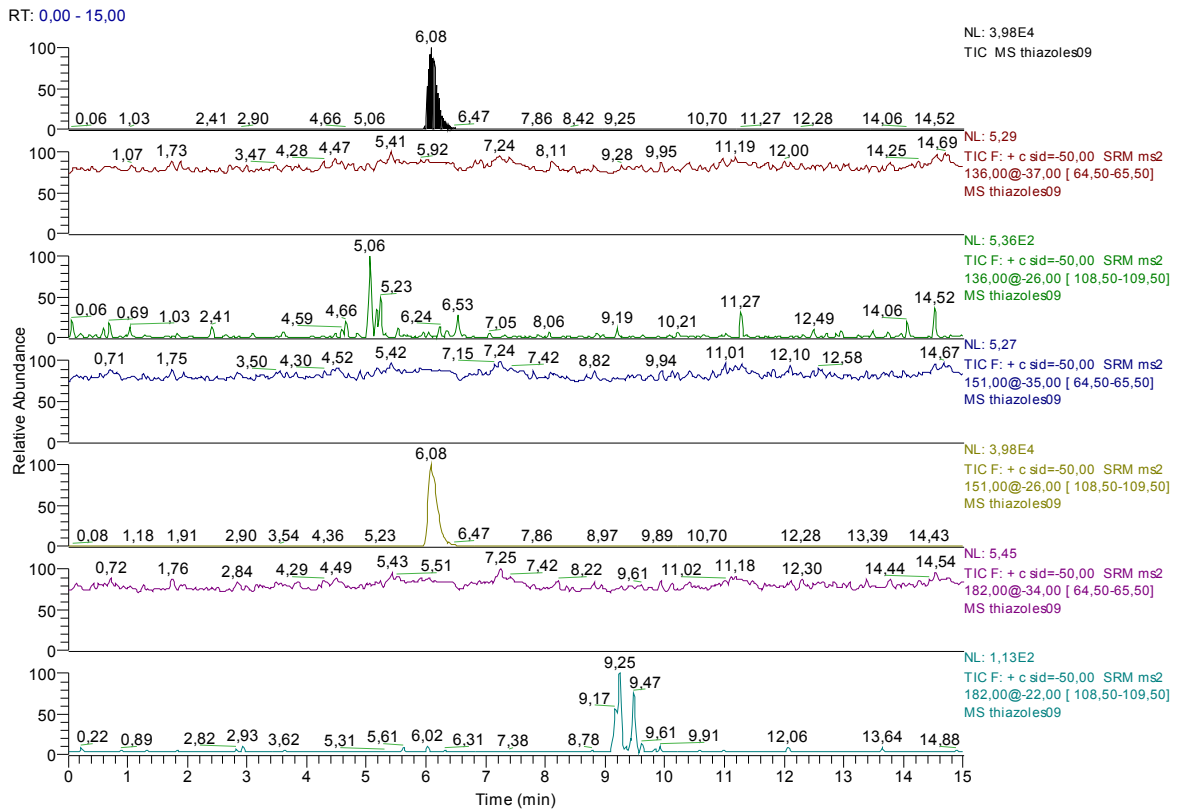
Χρωματογράφημα 1A-4 : Πρότυπο διάλυμα ΒΤ, ΑΒΤ, ΜΤΒΤ 250ppb με ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή 20eV και αυτόματο εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού.



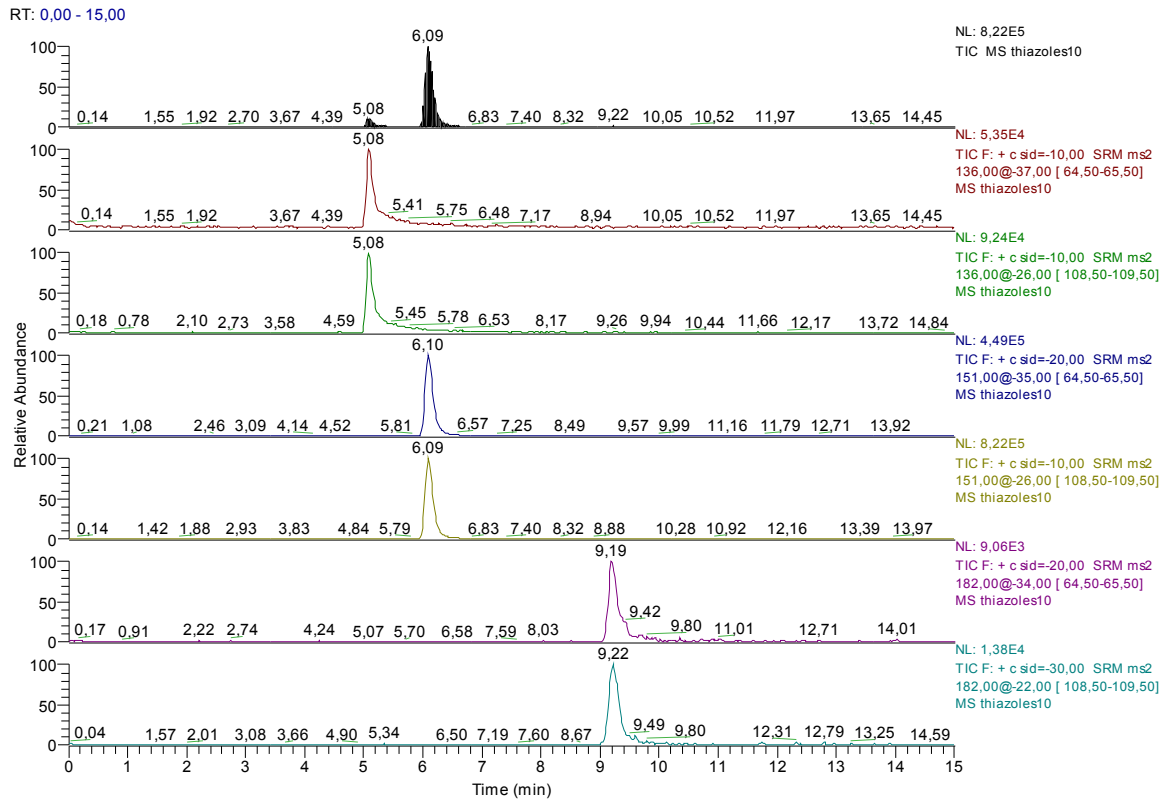
Χρωματογράφημα 1A-5 : Πρότυπο διάλυμα ΒΤ, ΑΒΤ, ΜΤΒΤ 250ppb με ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή 30eV και αυτόματο εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού.



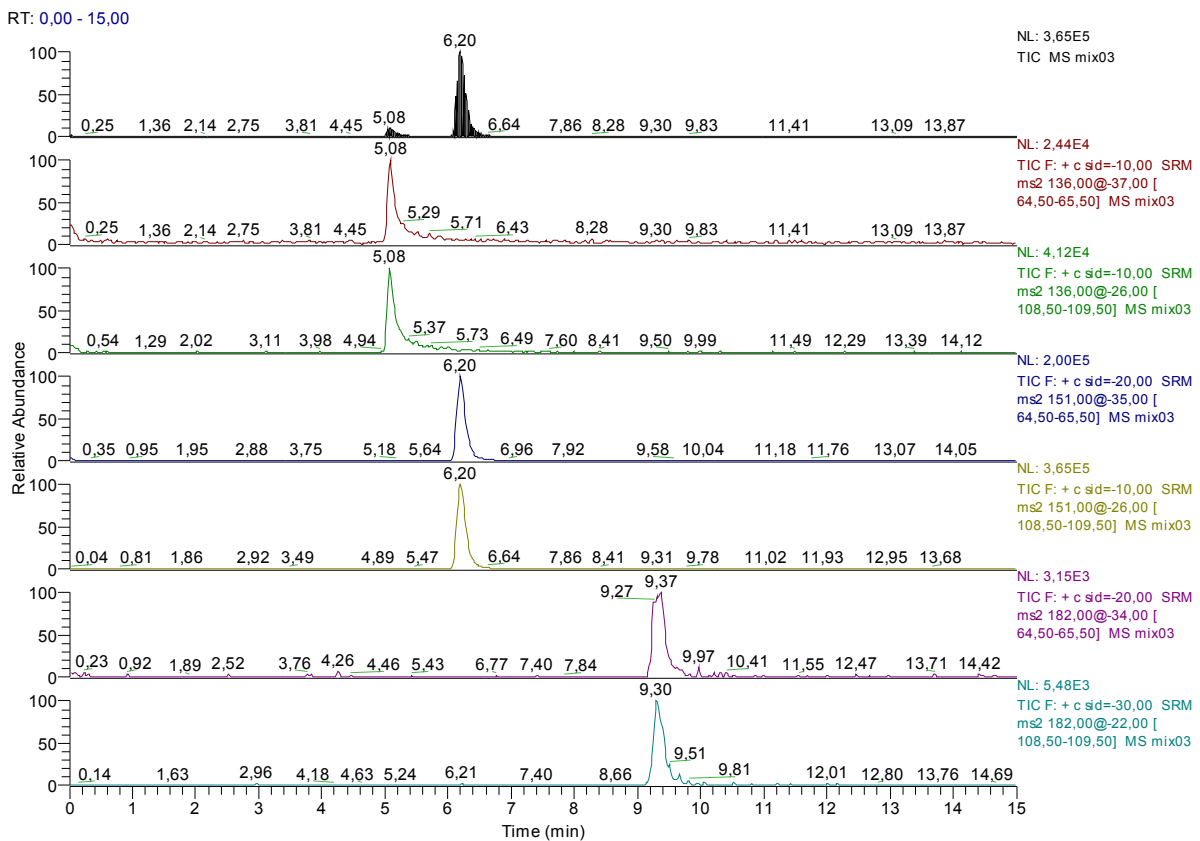
Χρωματογράφημα 1A-6 : Πρότυπο διάλυμα ΒΤ, ΑΒΤ, ΜΤΒΤ 250ppb με ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή 40eV και αυτόματο εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού.



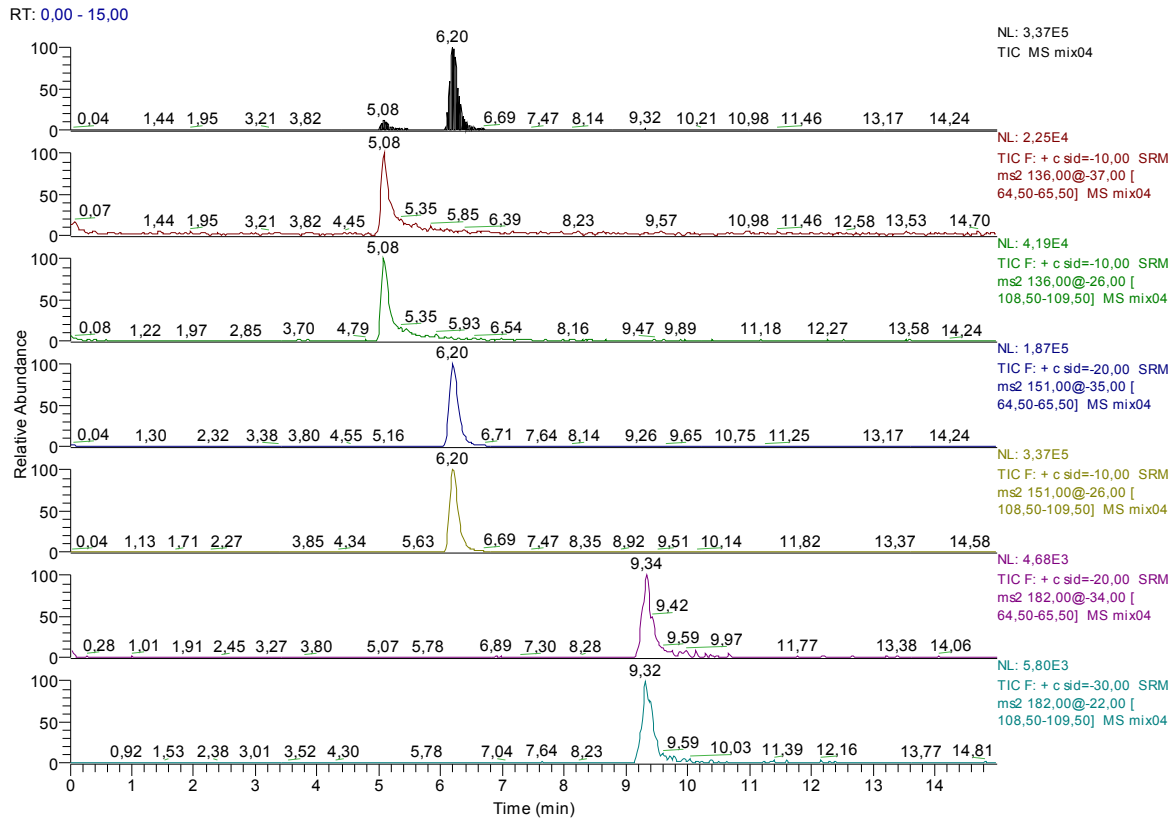
Χρωματογράφημα 1A-7 : Πρότυπο διάλυμα ΒΤ, ΑΒΤ, ΜΤΒΤ 250ppb με ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή 50eV και αυτόματο εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού.



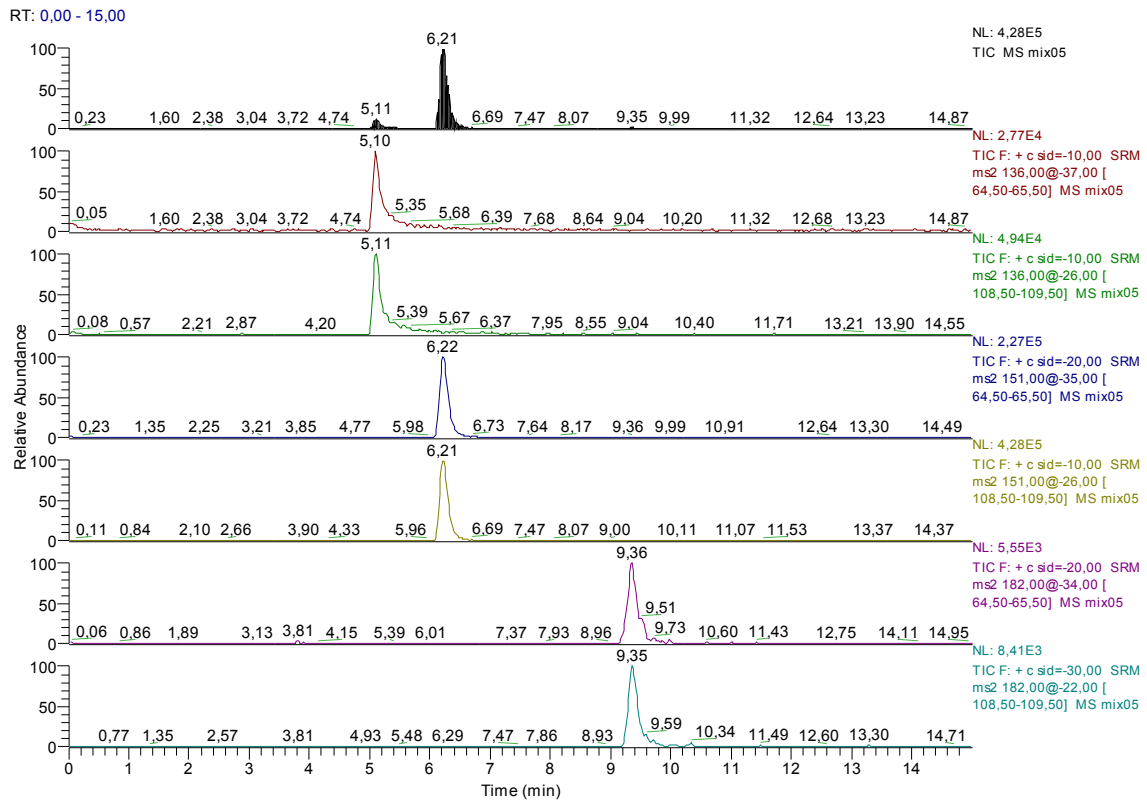
Χρωματογράφημα 1A-8 : Πρότυπο διάλυμα ΒΤ, ΑΒΤ, ΜΤΒΤ 250ppb με τη βέλτιστη ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή για την κάθε ένωση και αυτόματο εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού.



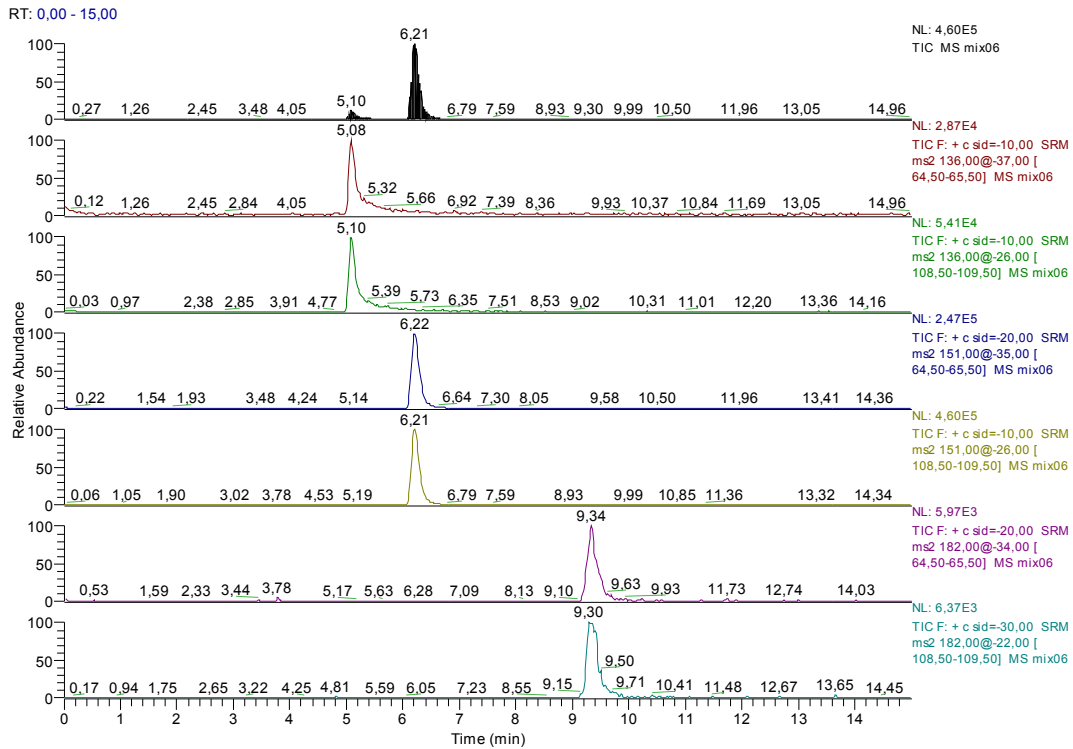
Χρωματογράφημα 1A-9 : Πρότυπο μίγμα ΒΤ, ΑΒΤ, ΜΤΒΤ 250ppb με τις βέλτιστες τιμές της ενέργειας πρόσκρουσης στη πηγή και το εφαρμοζόμενο δυναμικό του κυλινδρικού φακού αυτόματο.



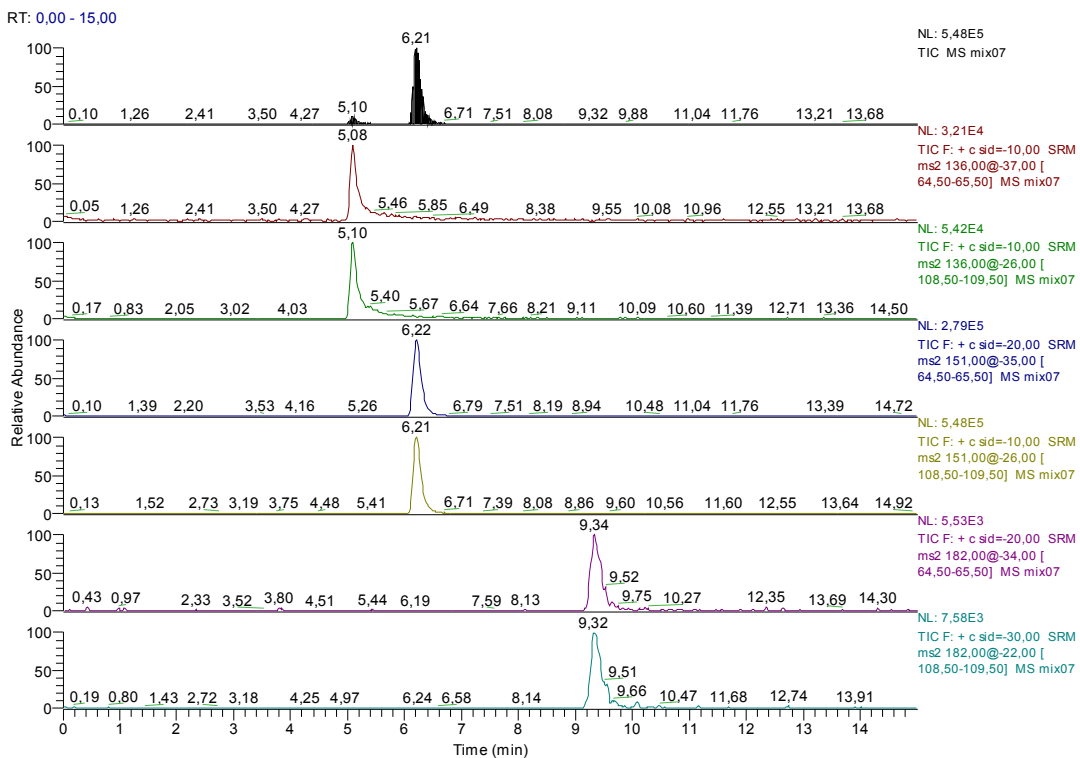
Χρωματογράφημα 1A-10 : Πρότυπο μίγμα ΒΤ, ΑΒΤ, ΜΤΒΤ 250ppb με τις βέλτιστες τιμές της ενέργειας πρόσκρουσης στη πηγή και το εφαρμοζόμενο δυναμικό του κυλινδρικού φακού 60V για την κάθε ένωση.



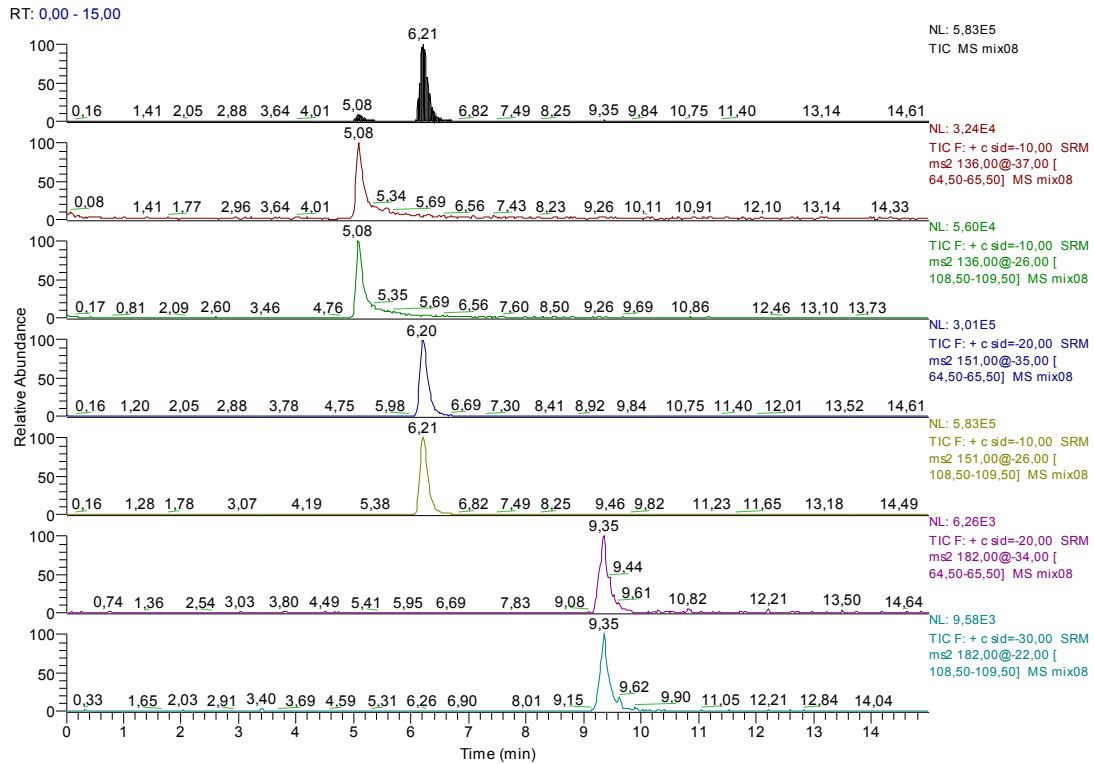
Χρωματογράφημα 1A-11 : Πρότυπο μίγμα ΒΤ, ΑΒΤ, ΜΤΒΤ 250ppb με τις βέλτιστες τιμές της ενέργειας πρόσκρουσης στη πηγή και το εφαρμοζόμενο δυναμικό του κυλινδρικού φακού 80V για την κάθε ένωση.



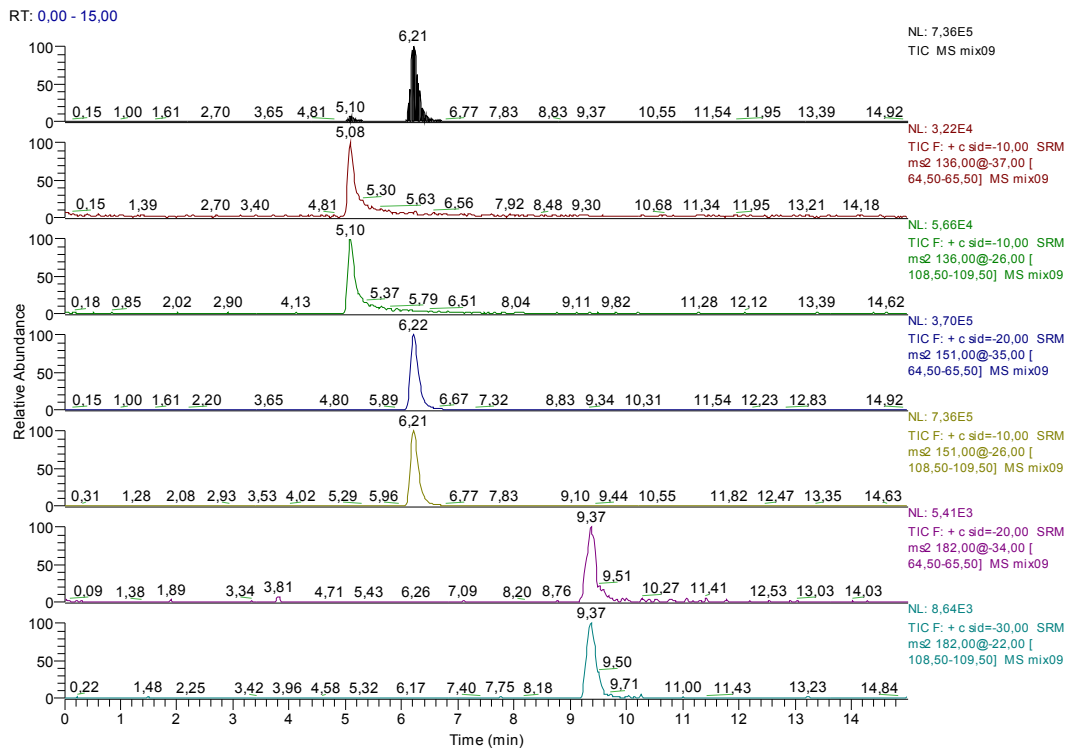
Χρωματογράφημα 1A-12 : Πρότυπο μίγμα ΒΤ, ΑΒΤ, ΜΤΒΤ 250ppb με τις βέλτιστες τιμές της ενέργειας πρόσκρουσης στη πηγή και το εφαρμοζόμενο δυναμικό του κυλινδρικού φακού 100V για την κάθε ένωση.



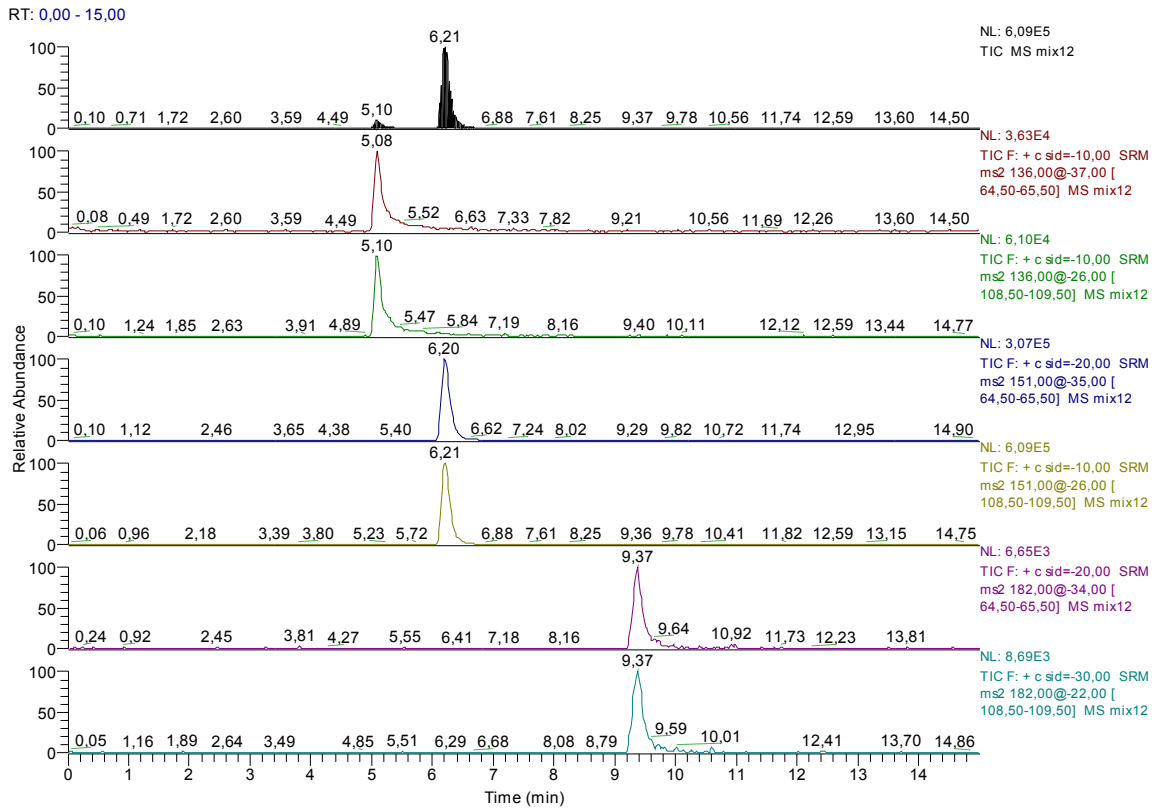
Χρωματογράφημα 1A-13 : Πρότυπο μίγμα ΒΤ, ΑΒΤ, ΜΤΒΤ 250ppb με τις βέλτιστες τιμές της ενέργειας πρόσκρουσης στη πηγή και το εφαρμοζόμενο δυναμικό του κυλινδρικού φακού 120V για την κάθε ένωση.



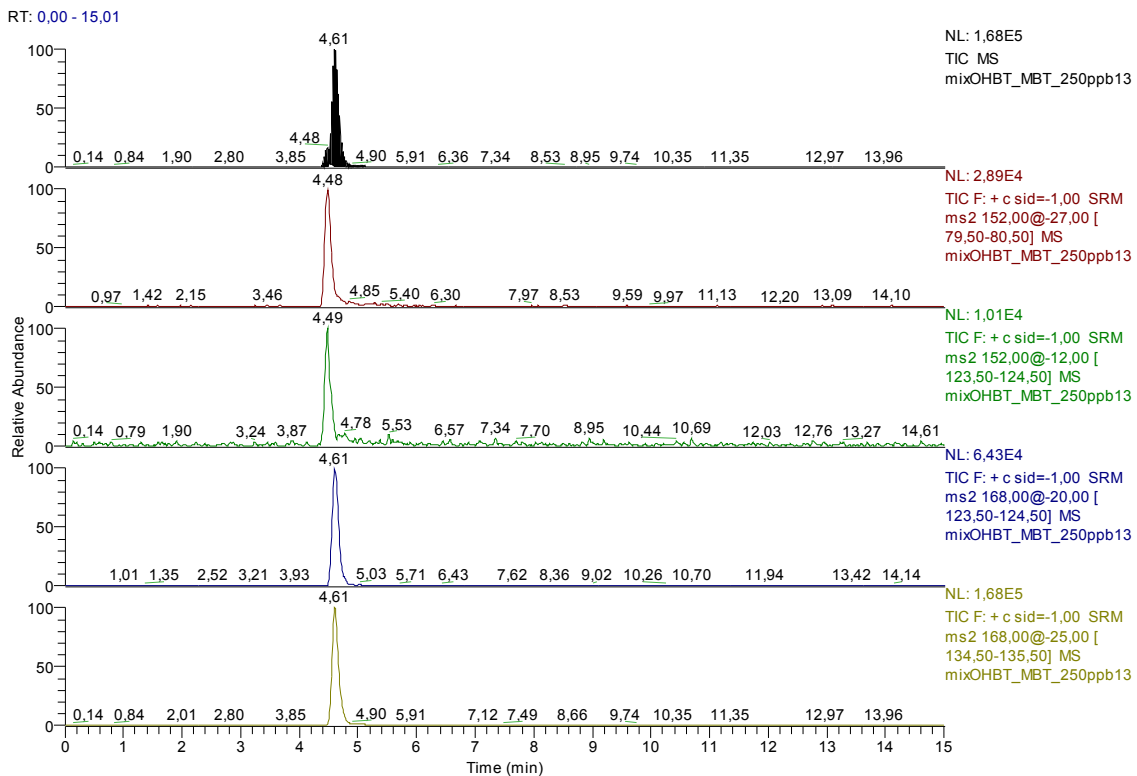
Χρωματογράφημα 1A-14 : Πρότυπο μίγμα ΒΤ, ΑΒΤ, ΜΤΒΤ 250ppb με τις βέλτιστες τιμές της ενέργειας πρόσκρουσης στη πηγή και το εφαρμοζόμενο δυναμικό του κυλινδρικού φακού 140V για την κάθε ένωση.



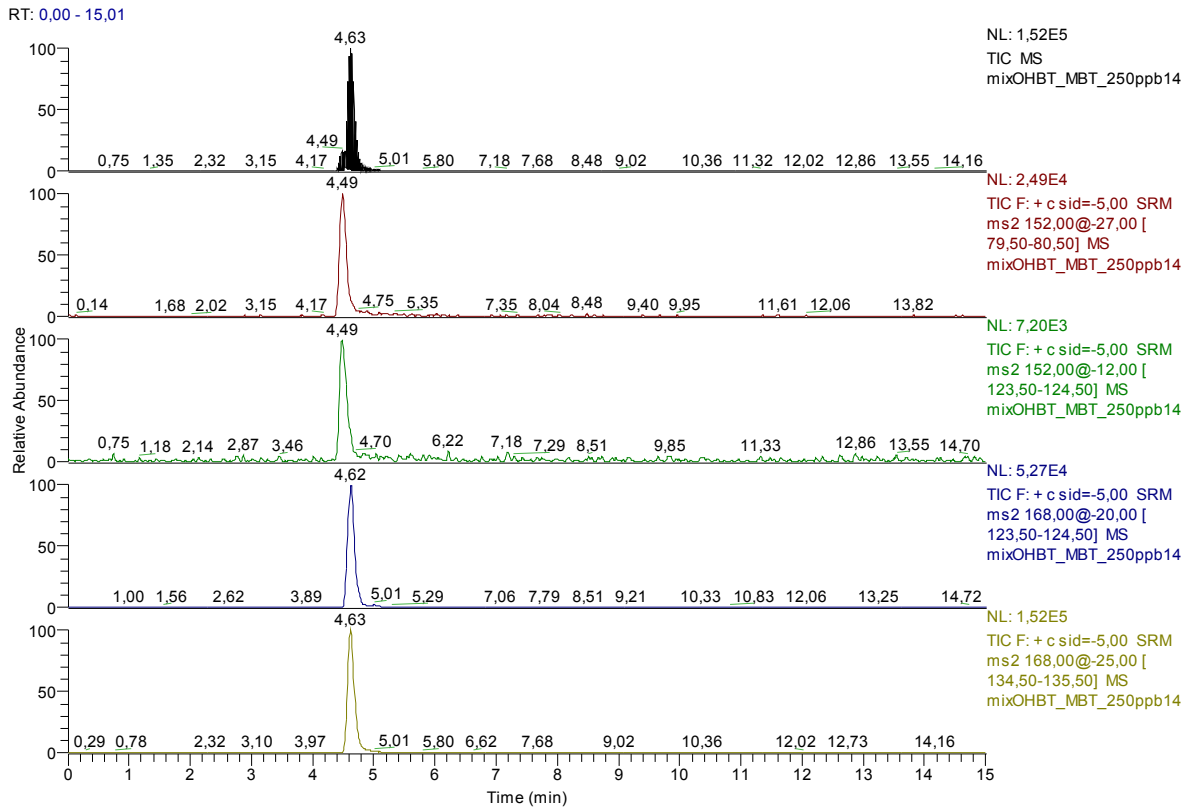
Χρωματογράφημα 1A-15 : Πρότυπο μίγμα ΒΤ, ΑΒΤ, ΜΤΒΤ 250ppb με τις βέλτιστες τιμές της ενέργειας πρόσκρουσης στη πηγή και το εφαρμοζόμενο δυναμικό του κυλινδρικού φακού 160V για την κάθε ένωση.



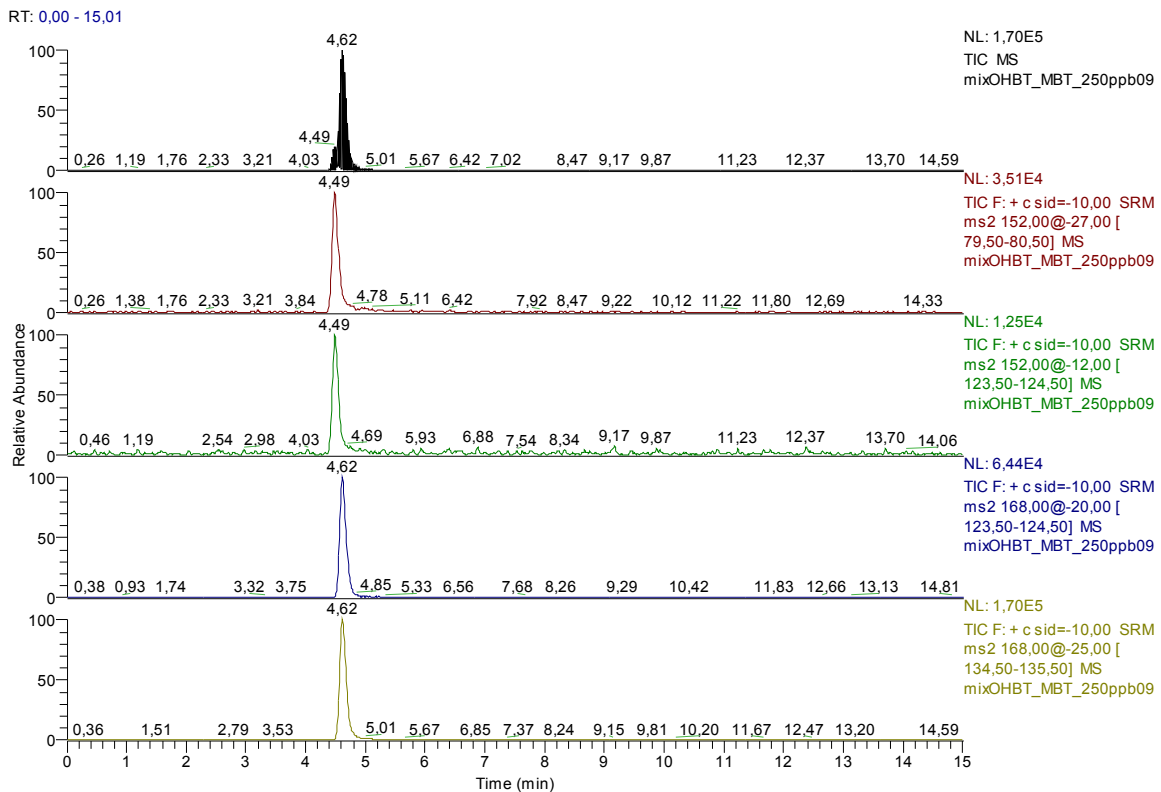
Χρωματογράφημα 1A-16 : Πρότυπο μίγμα BT, ABT, MTBT 250ppb με τις βέλτιστες τιμές της ενέργειας πρόσκρουσης στη πηγή και του εφαρμοζόμενο δυναμικού του κυλινδρικού φακού για την κάθε ένωση.



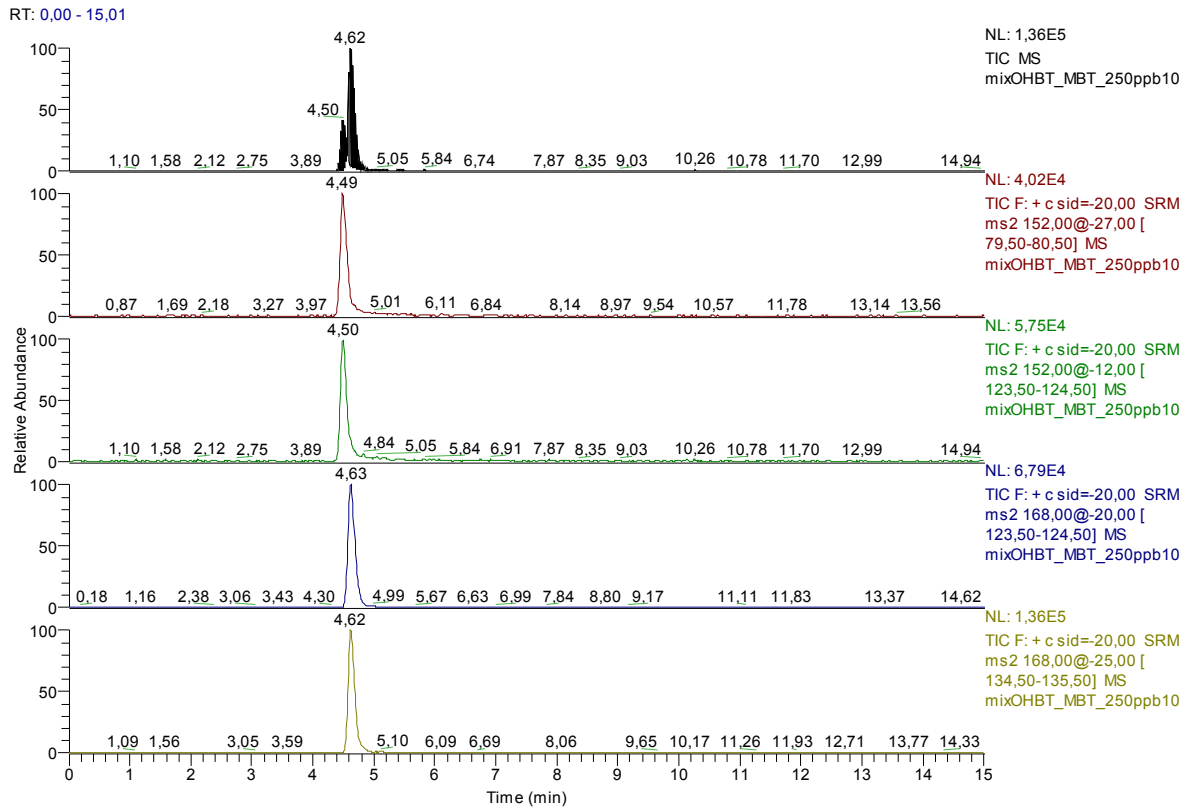
Χρωματογράφημα 1A-17 : Πρότυπο διάλυμα MBT, OHBT 250ppb με ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή 1eV και αυτόματο εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού.



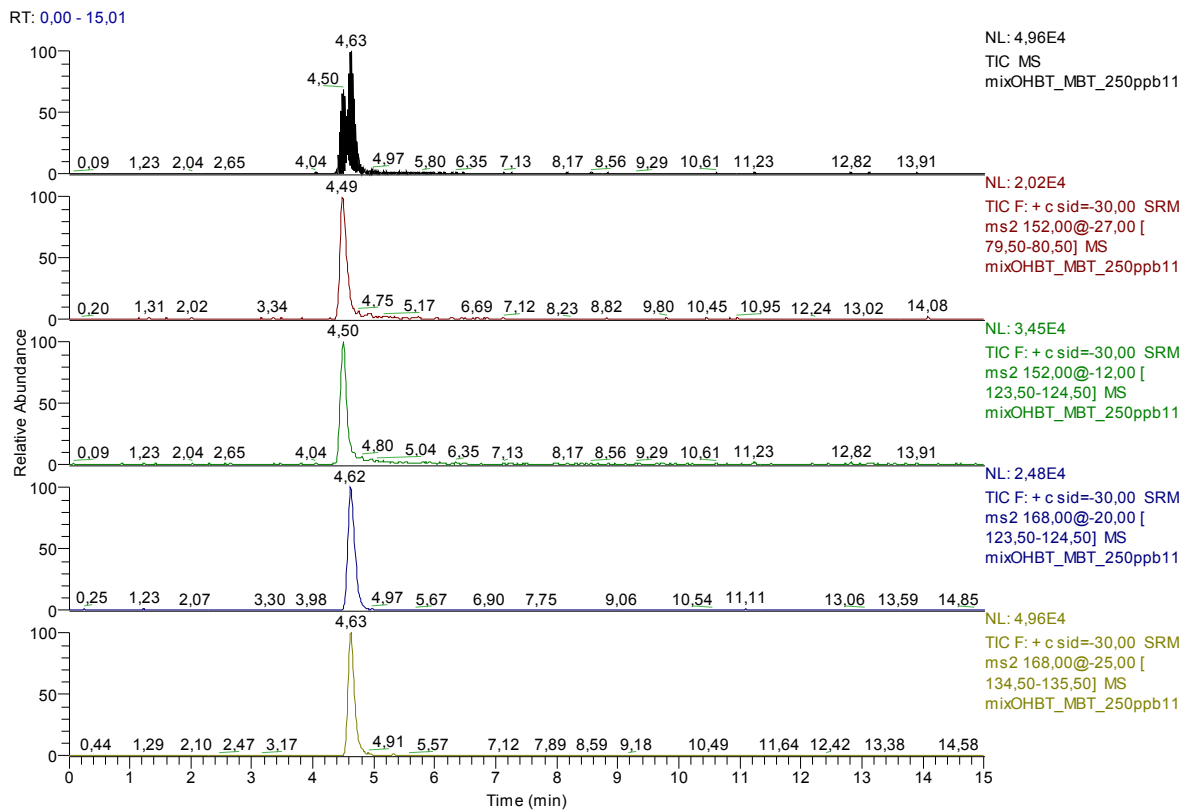
Χρωματογράφημα 1A-18 : Πρότυπο διάλυμα MBT, OHBT 250ppb με ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή 5eV και αυτόματο εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού.



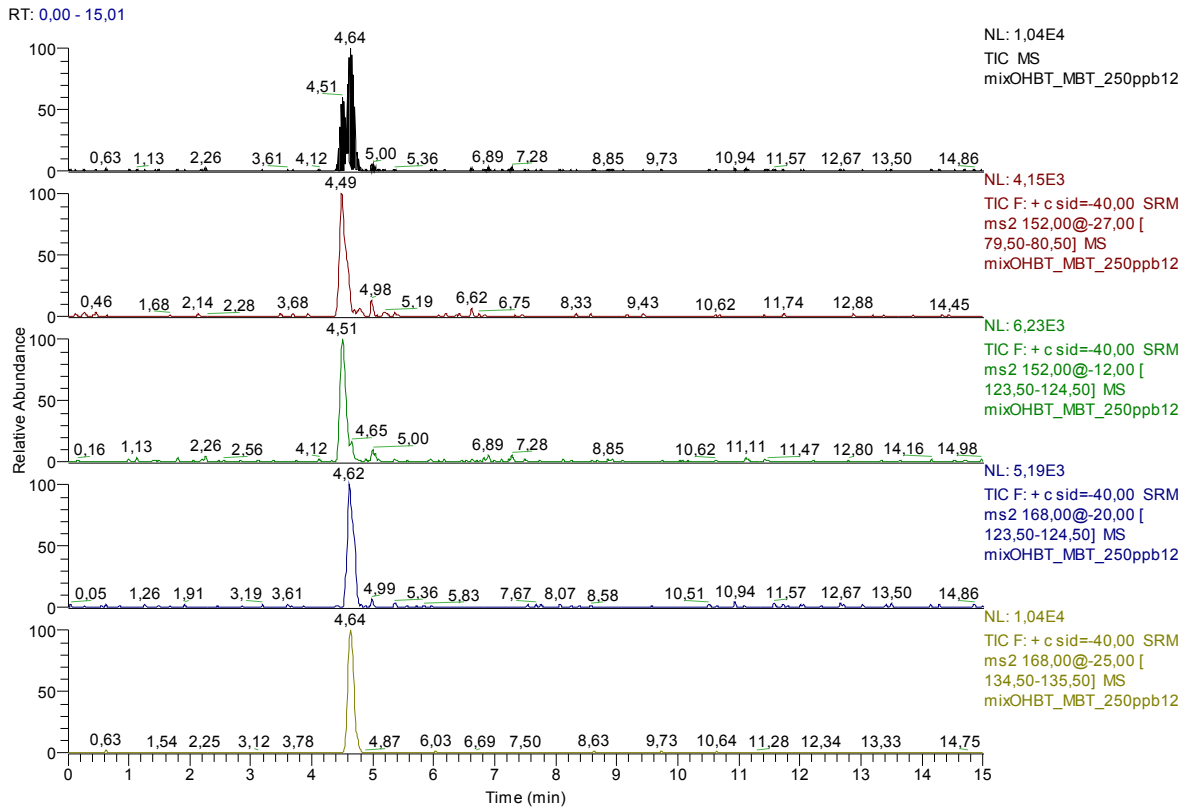
Χρωματογράφημα 1A-19 : Πρότυπο διάλυμα MBT, OHBT 250ppb με ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή 10eV και αυτόματο εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού.



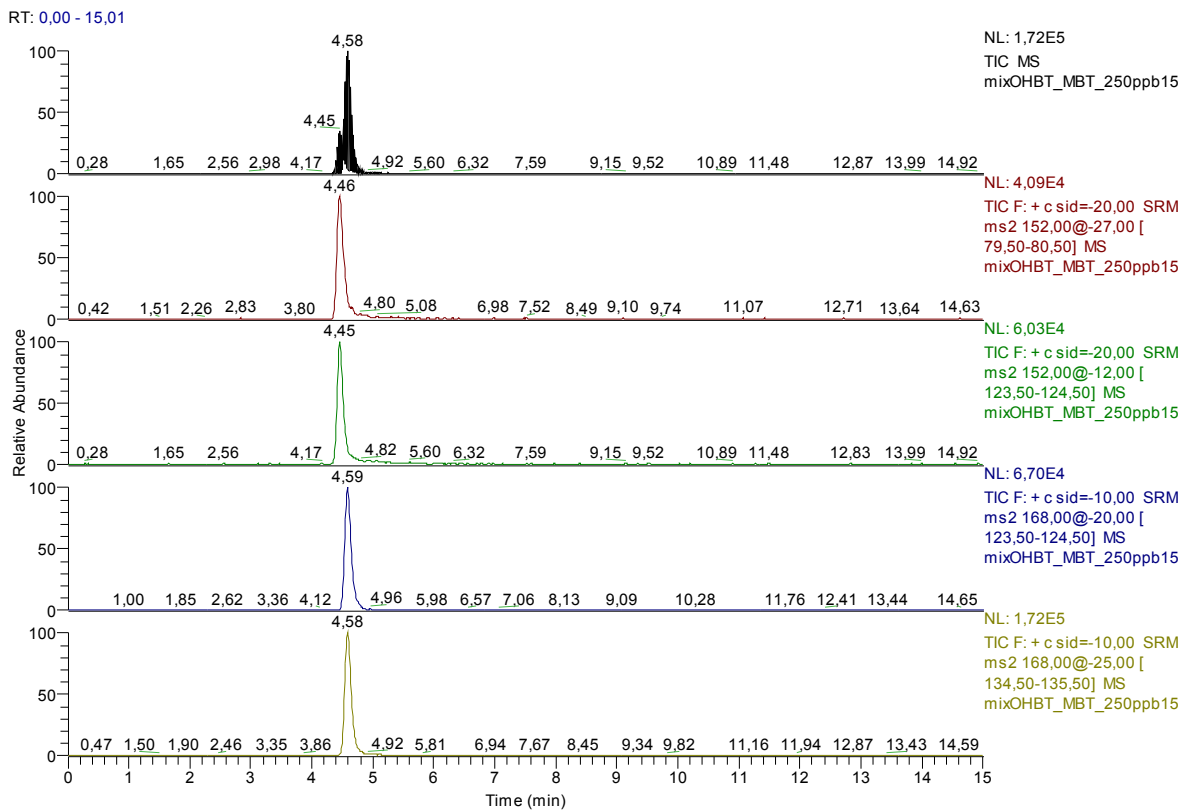
Χρωματογράφημα 1A-20 : Πρότυπο διάλυμα MBT, OHBT 250ppb με ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή 20eV και αυτόματο εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού.



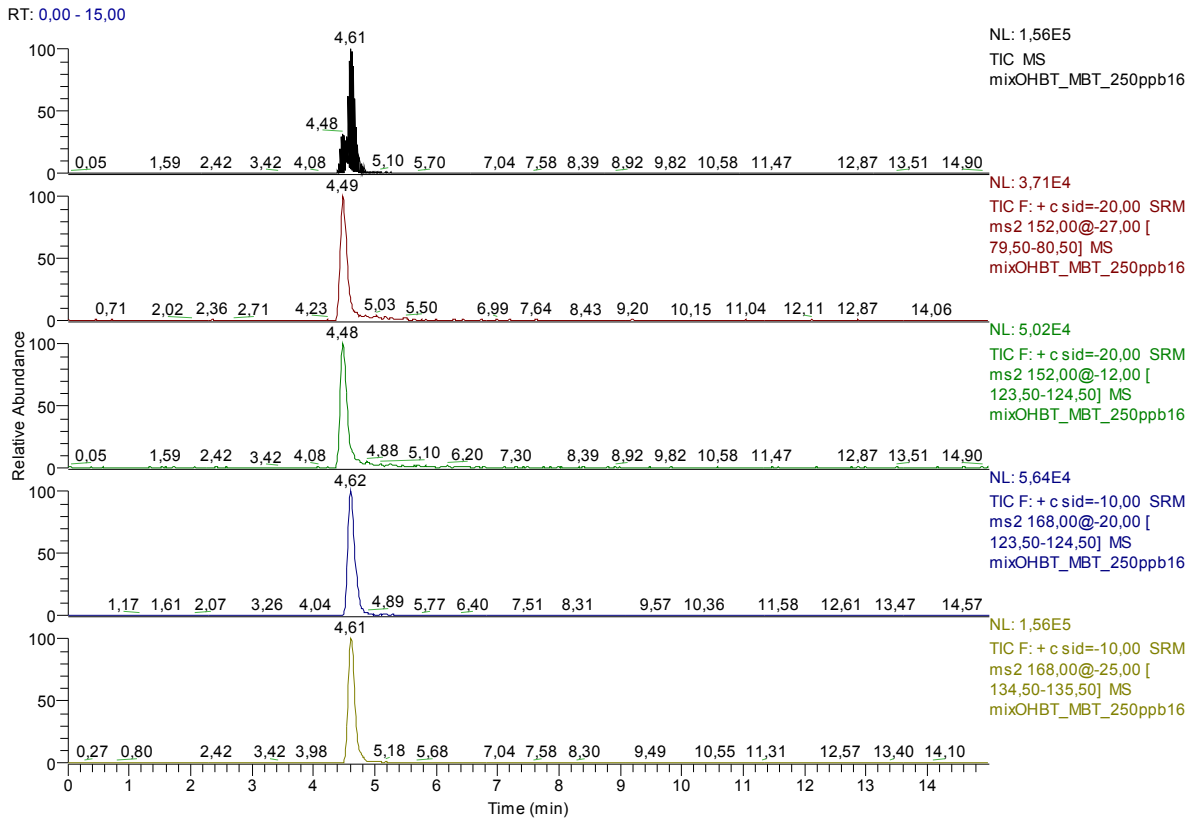
Χρωματογράφημα 1A-21 : Πρότυπο διάλυμα MBT, OHBT 250ppb με ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή 30eV και αυτόματο εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού.



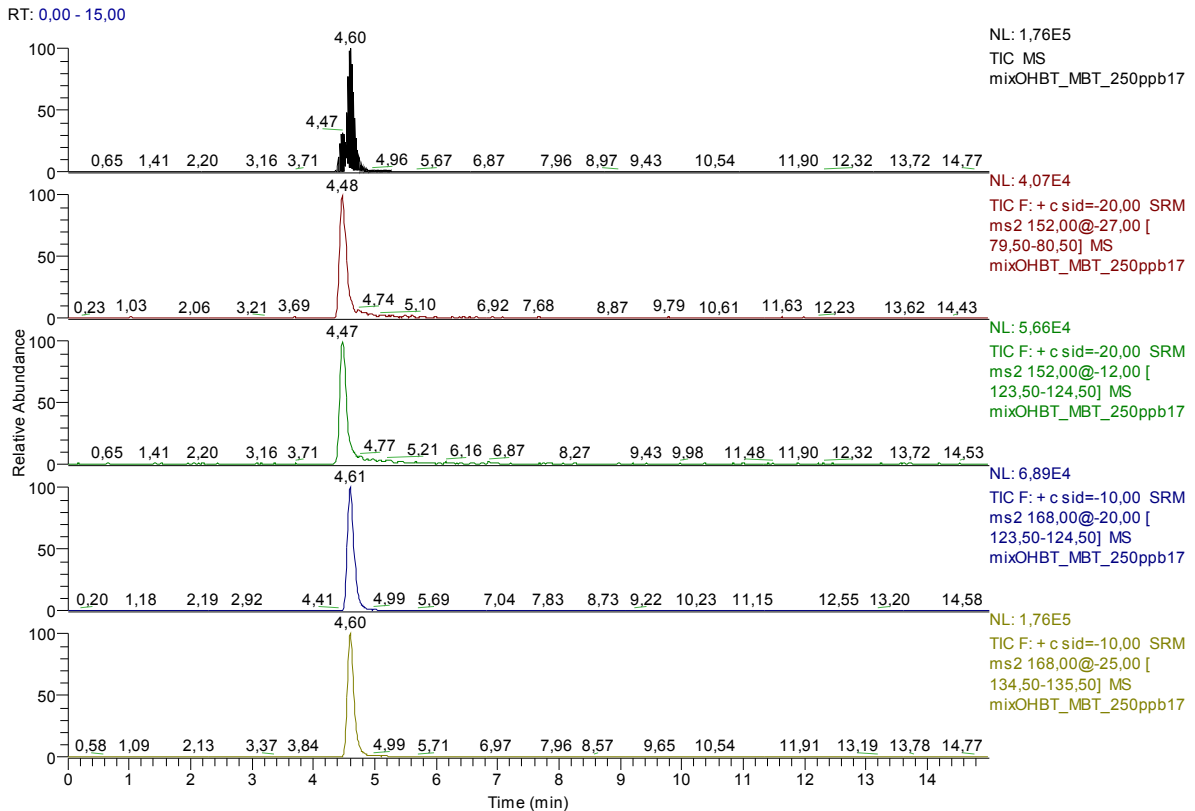
Χρωματογράφημα 1A-22 : Πρότυπο διάλυμα MBT, OHBT 250ppb με ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή 40eV και αυτόματο εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού.



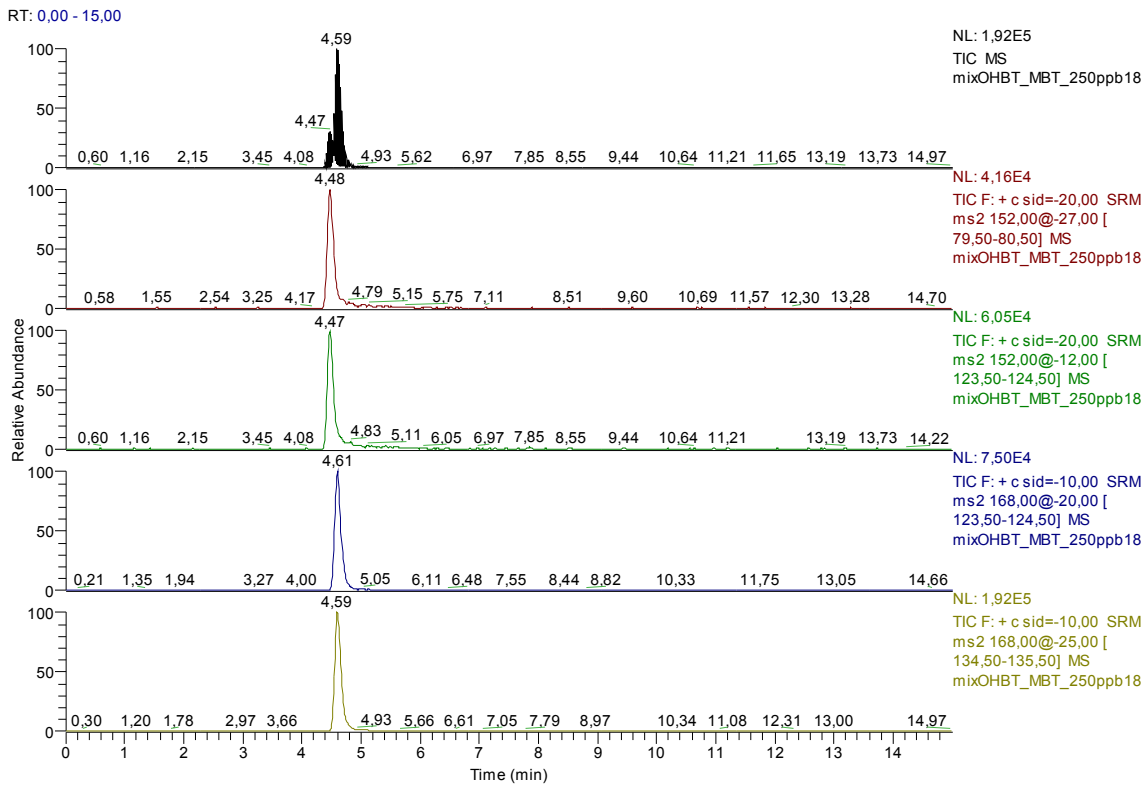
Χρωματογράφημα 1A-23 : Πρότυπο διάλυμα MBT, OHBT 250ppb με τη βέλτιστη ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή και αυτόματο εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού



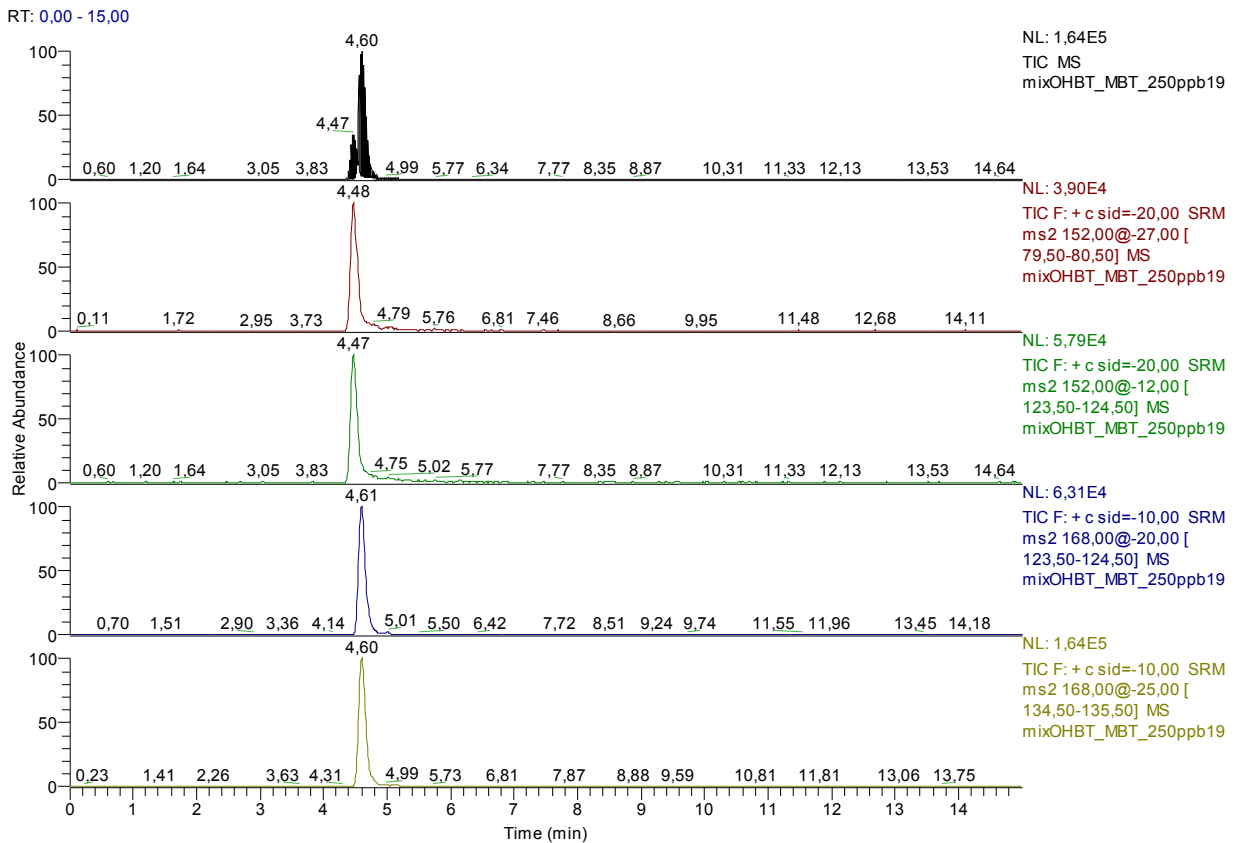
Χρωματογράφημα 1A-24 : Πρότυπο διάλυμα MBT, OHBT 250ppb με τη βέλτιστη ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή και 60V εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού



Χρωματογράφημα 1A-25 : Πρότυπο διάλυμα MBT, OHBT 250ppb με τη βέλτιστη ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή και 80V εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού



Χρωματογράφημα 1A-26 : Πρότυπο διάλυμα MBT, OHBT 250ppb με τη βέλτιστη ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή και 100V εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού



Χρωματογράφημα 1A-27 : Πρότυπο διάλυμα MBT, OHBT 250ppb με τη βέλτιστη ενέργεια πρόσκρουσης στη πηγή και 120V εφαρμοζόμενο δυναμικό κυλινδρικού φακού

Β. Υπολογισμός ανάκτησης της μεθόδου

Συνθήκες οργάνου :

Στήλη : Hypersil BDS C8, 5μ, 250X4 mm

Ροή : 1000μl/min

Κινητή φάση : μεθανόλη/υπερκάθαρο νερό 52/48 και 0,1% οξικό οξύ

Πίνακας 1B-1 : Ανάκτηση θυγατρικών ιόντων κάθε ένωσης με GSH και χωρίς GSH με διαφορετική ροή στη διάταξη πολλών μικροστηλών (magnifold) για τη διαλυτή φάση.

		ABT		BT		MTBT		OHBT		MBT	
		m/z μητρικό ιόν 151		m/z μητρικό ιόν 136		m/z μητρικό ιόν 182		m/z μητρικό ιόν 152		m/z μητρικό ιόν 168	
μετά από εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)		θυγατρικά ιόντα (SRM)		θυγατρικά ιόντα (SRM)		θυγατρικά ιόντα (SRM)		θυγατρικά ιόντα (SRM)		θυγατρικά ιόντα (SRM)	
		109	65	109	65	109	65	124	80	135	124
		ποσοστό (%)									
Χωρίς προσθήκη GSH και ροή σε διάταξη πολλών μικροστηλών 2 ml/min	mixA2	77,75	75,49	74,41	69,25	113,65	113,24	91,33	89,02	0,85	1,03
	mixB2	116,65	110,02	79,48	78,15	115,25	105,78	122,01	122,41	0,61	0,83
	mixC2	109,10	103,54	93,37	95,14	127,24	110,93	118,91	121,79	2,75	2,84
	μέσος όρος	101,17	96,35	82,42	80,85	118,72	109,98	110,75	111,08	1,40	1,57
	τυπική απόκλιση	20,63	18,35	9,81	13,15	7,43	3,82	16,89	19,10	1,17	1,11
Χωρίς προσθήκη GSH και ροή σε διάταξη πολλών μικροστηλών 4 ml/min	mixA3	100,40	96,35	90,69	89,73	124,57	118,32	101,01	97,56	0,60	0,81
	mixB3	116,91	112,31	120,08	126,11	140,16	130,21	126,98	129,26	1,60	1,71
	mixC3	115,69	111,93	111,83	102,55	128,64	129,86	124,84	127,42	2,12	2,41
	μέσος όρος	111,00	106,86	107,54	106,13	131,13	126,13	117,61	118,08	1,44	1,64
	τυπική απόκλιση	9,20	9,11	15,16	18,45	8,09	6,77	14,41	17,79	0,77	0,81
Με προσθήκη GSH 2,5ml 0,1M στο καθένα και ροή 2 ml/min	mixA1	83,42	81,71	72,37	69,44	94,43	94,99	88,35	87,40	24,30	23,79
	mixB1	99,73	96,07	84,41	80,31	114,23	106,19	107,36	105,72	28,79	28,37
	mixC1	105,41	99,05	103,55	95,69	134,18	119,54	102,37	105,24	30,83	28,37
	μέσος όρος	96,19	92,28	86,78	81,81	114,28	106,91	99,36	99,45	27,97	26,84
	τυπική απόκλιση	11,41	9,27	15,73	13,19	19,87	12,29	9,85	10,44	3,34	2,64
Με προσθήκη GSH 4ml 0,1M στο καθένα και ροή 2 ml/min	mixA1	84,87	81,34	33,12	32,17	99,68	87,25	79,99	81,33	49,37	50,81
	mixB1	89,55	85,57	91,68	87,96	136,65	120,40	78,59	87,51	46,67	48,36
	mixC1	86,18	84,01	75,82	75,99	134,66	121,86	76,20	77,49	42,92	43,88
	μέσος όρος	86,87	83,64	83,75	81,97	123,66	109,84	78,26	82,11	46,32	47,69
	τυπική απόκλιση	2,41	2,14	30,29	29,37	20,80	19,57	1,92	5,06	3,24	3,52
Με προσθήκη GSH 5ml 0,1M στο καθένα και ροή 2 ml/min	mixA2	84,08	79,74	91,38	89,38	128,57	111,48	85,33	89,98	66,61	67,60
	mixB2	96,00	91,69	113,62	111,41	153,96	136,23	92,48	102,89	71,42	76,12
	mixC2	88,00	83,19	89,63	83,31	130,53	117,78	87,09	85,93	66,40	69,05
	μέσος όρος	89,36	84,87	98,21	94,70	137,69	121,83	88,30	92,93	68,14	70,92
	τυπική απόκλιση	6,08	6,15	13,38	14,79	14,13	12,86	3,73	8,86	2,84	4,56

Πίνακας 1B-2 : Ανάκτηση θυγατρικών ιόντων κάθε ένωσης με 5ml GSH 0,1M κατά τη σωματιδιακή φάση.

μετά από εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)	ABT		BT		MTBT		OHBT		MBT	
	m/z μητρικό ιόν 151		m/z μητρικό ιόν 136		m/z μητρικό ιόν 182		m/z μητρικό ιόν 152		m/z μητρικό ιόν 168	
	Θυγατρικά ιόντα (SRM)		Θυγατρικά ιόντα (SRM)		Θυγατρικά ιόντα (SRM)		Θυγατρικά ιόντα (SRM)		Θυγατρικά ιόντα (SRM)	
	109	65	109	65	109	65	124	80	135	124
	ποσοστό (%)									
mixA	125,14	76,37	105,01	100,80	74,46	74,83	108,28	110,17	86,71	87,49
mixB	100,14	56,51	101,29	97,58	74,21	68,27	103,65	110,69	76,24	74,08
mixC	117,47	61,85	151,82	146,89	101,05	104,14	114,58	117,92	100,76	114,45
μέσος όρος	114,25	64,91	119,38	115,09	83,24	82,41	108,83	112,93	94,57	92,01
τυπική απόκλιση	17,68	14,04	2,63	2,28	0,18	4,64	3,27	0,37	7,40	9,48

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. Επίδραση της μήτρας του δείγματος

Πίνακες και καμπύλες βαθμονόμησης

Συνθήκες οργάνου :

Στήλη : Hypersil BDS C8, 5μ, 250X4 mm

Ροή : 1000μl/min

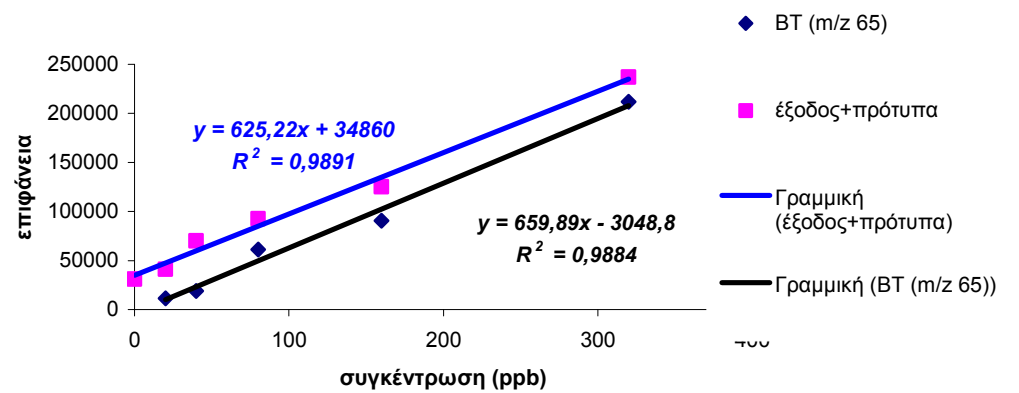
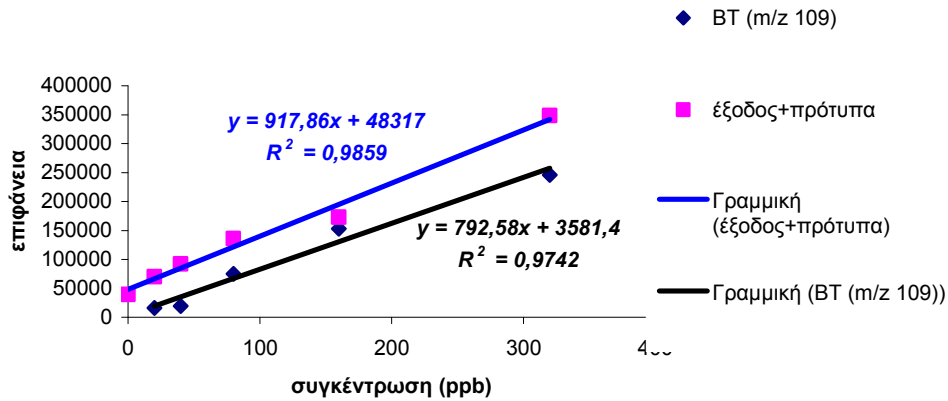
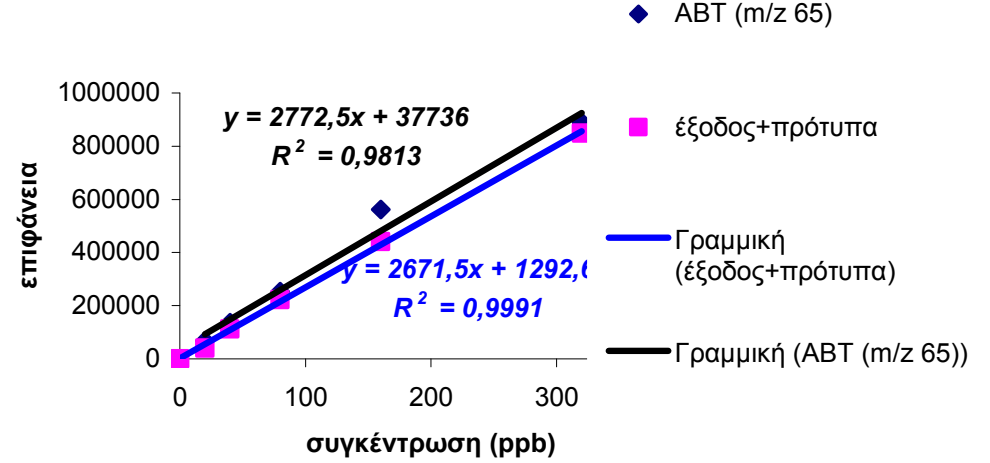
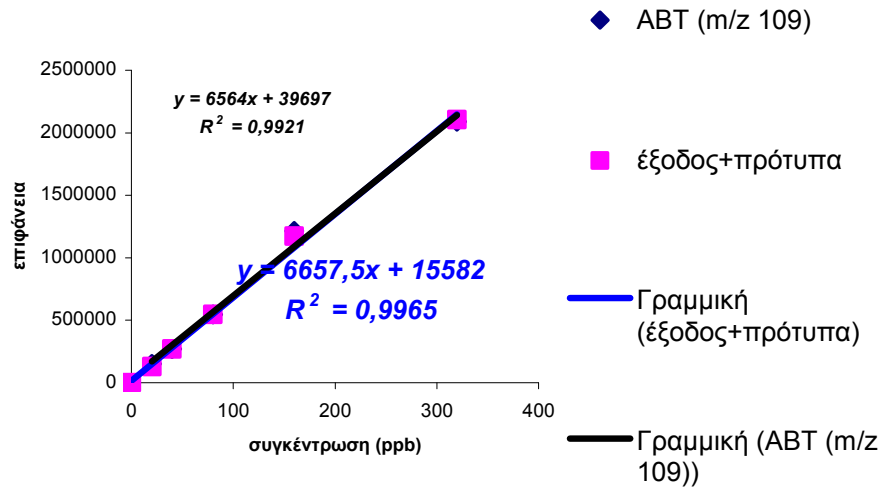
Κινητή φάση : μεθανόλη/υπερκάθαρο νερό 52/48 και 0,1% οξικό οξύ

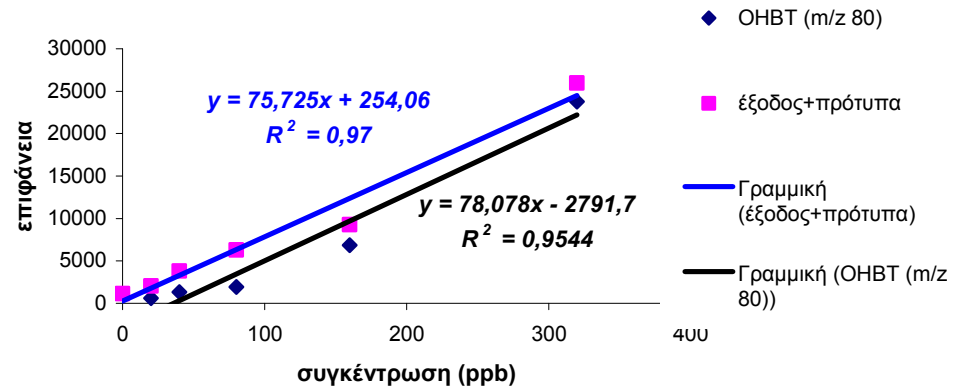
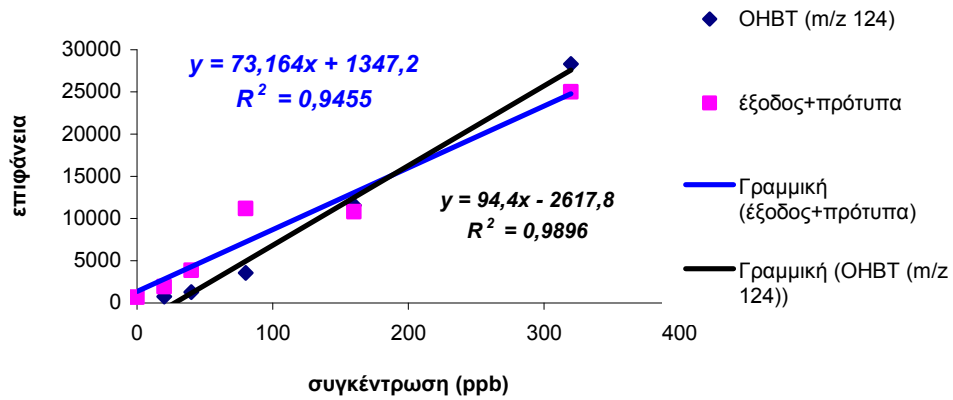
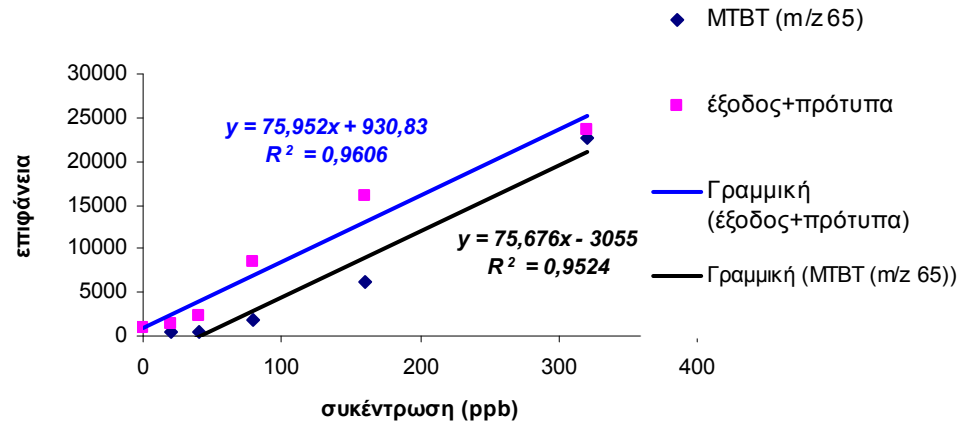
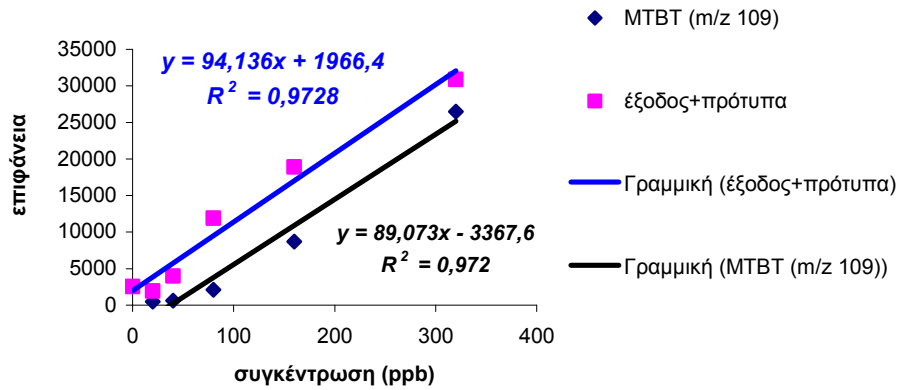
Πίνακας 2Α-1 : Ολοκλήρωμα κάθε κορυφής από πρότυπα διαλύματα για την κατασκευή καμπύλων βαθμονόμησης και ολοκλήρωμα του δείγματος με προσθήκη γνωστής ποσότητας

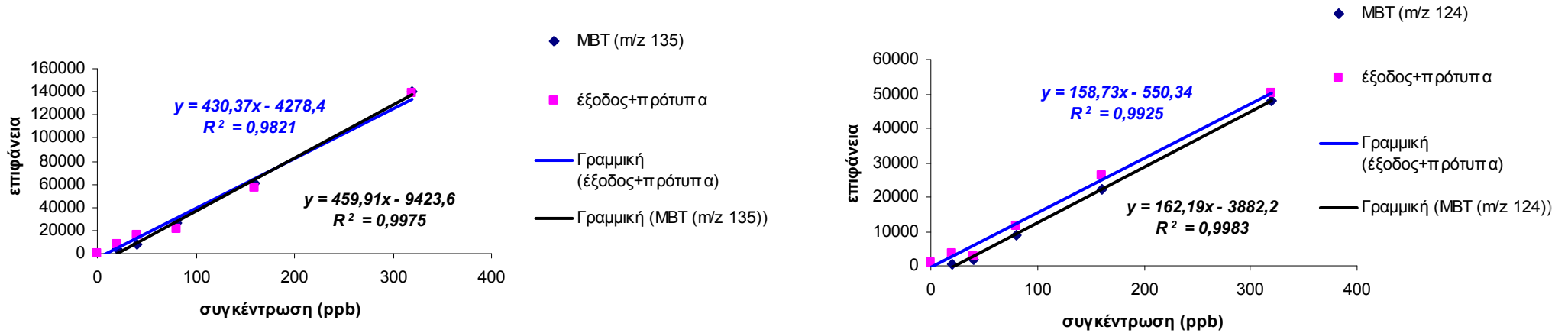
Συγκεντρώσεις (ppb)	ΑΒΤ			ΒΤ			ΜΤΒΤ			ΟΗΒΤ			ΜΒΤ			
	m/z μητρικό ιόν 151			m/z μητρικό ιόν 136			m/z μητρικό ιόν 182			m/z μητρικό ιόν 152			m/z μητρικό ιόν 168			
	Θυγατρικά ιόντα (SRM)			Θυγατρικά ιόντα (SRM)			Θυγατρικά ιόντα (SRM)			Θυγατρικά ιόντα (SRM)			Θυγατρικά ιόντα (SRM)			
	109	65	Επιφάνεια1/ Επιφάνεια2	109	65	Επιφάνεια1/ Επιφάνεια2	109	65	Επιφάνεια1/ Επιφάνεια2	124	80	Επιφάνεια1/ Επιφάνεια2	135	124	Επιφάνεια1/ Επιφάνεια2	
Επιφάνεια																
Ομάδα 1	20	149130	66036	2,26	13076	9680	1,35	29,92	574	0,05	286	557	0,51	4594	710	6,47
	40	244682	120068	2,04	16366	19445	0,84	271	666	0,41	1464	2093	0,70	5416	1966	2,75
	80	529302	248264	2,13	64682	57280	1,13	2380	2448	0,97	2336	2819	0,83	23982	9851	2,43
	160	1125880	547230	2,06	140104	105124	1,33	11288	6756	1,67	10014	6722	1,49	52492	19334	2,72
	320	1490680	668282	2,23	182768	237700	0,77	27488	19470	1,41	26646	23590	1,13	138471	49391	2,80
Ομάδα 2	20	150382	67556	2,23	18458	13156	1,40	940	350	2,69	1232	659	1,87	2393	436	5,49
	40	295796	153078	1,93	21844	18684	1,17	972	424	2,29	1118	535	2,09	9369	1256	7,46
	80	560630	256850	2,18	85810	64958	1,32	1854	1146	1,62	4768	1000	4,77	29602	7670	3,86
	160	1305162	577589	2,26	166284	76040	2,19	6146	5438	1,13	13057	6982	1,87	69148	24734	2,80
	320	2684641	1110354	2,42	309218	185704	1,67	25406	26016	0,98	29957	23942	1,25	140584	46940	2,99
Μέσος όρος	20	<i>149756</i>	<i>66796</i>	2,24	<i>15767</i>	<i>11418</i>	1,38	<i>484,9</i> <i>6</i>	<i>462</i>	1,05	<i>759</i>	<i>608</i>	1,25	<i>3493,5</i>	<i>573</i>	6,10
	40	<i>270239</i>	<i>136573</i>	1,98	<i>19105</i>	<i>19064,5</i>	1,00	<i>621,5</i>	<i>545</i>	1,14	<i>1291</i>	<i>1314</i>	0,98	<i>7392,5</i>	<i>1611</i>	4,59
	80	<i>544966</i>	<i>252557</i>	2,16	<i>75246</i>	<i>61119</i>	1,23	<i>2117</i>	<i>1797</i>	1,18	<i>3552</i>	<i>1909,</i> <i>5</i>	1,86	<i>26792</i>	<i>8760,</i> <i>5</i>	3,06

160	1215521	562409, 5	2,16	153194	90582	1,69	8717	6097	1,43	11535,5	6852	1,68	60820	22034	2,76
320	2087661	889318	2,35	245993	211702	1,16	26447	22743	1,16	28301,5	23766	1,19	139527, 5	48165 ,5	2,90
είσοδος +υπερκάθαρο νερό	505	859	0,59	301158	294652	1,02	615	277	2,22	19481	17982	1,08	2777	259	10,72
είσοδος+20ppb	95614	11249	8,50	317690	348107	0,91	1672	1308	1,28	33037	18586	1,78	9088	1820	4,99
είσοδος+40ppb	223942	102842	2,18	263200	364946	0,72	4478	2476	1,81	40868	22708	1,80	17168	4872	3,52
είσοδος+80ppb	403004	202954	1,99	307478	384984	0,80	11562	3433	3,37	33347	22833	1,46	23900	7838	3,05
είσοδος+160ppb	820648	319768	2,57	488798	298780	1,64	12132	8916	1,36	55863	40660	1,37	52047	27958	1,86
είσοδος+320ppb	2103222	828500	2,54	538110	611466	0,88	26302	27666	0,95	76100	45782	1,66	144043	48190	2,99
έξοδος+υπερκάθ αρο νερό	866	98,08	8,83	39166	31062	1,26	2543	869	2,93	682	1125	0,61	483	750	0,64
έξοδος+20ppb	129528	40367	3,21	70159	40990	1,71	1916	1294	1,48	1930	2018	0,96	8558	3758	2,28
έξοδος+40ppb	268621	112128	2,40	92414	70006	1,32	3998	2344	1,71	3848	3796	1,01	15916	2842	5,60
έξοδος+80ppb	545464	222173	2,46	135664	92468	1,47	11920	8480	1,41	11179	6306	1,77	20516	11570	1,77
έξοδος+160ppb	1173507	440341	2,66	173148	125316	1,38	18900	16008	1,18	10812	9272	1,17	56366	26160	2,15
έξοδος+320ppb	2103160	848979	2,48	348426	236952	1,47	30886	23680	1,30	24994	25957	0,96	139318	50028	2,78

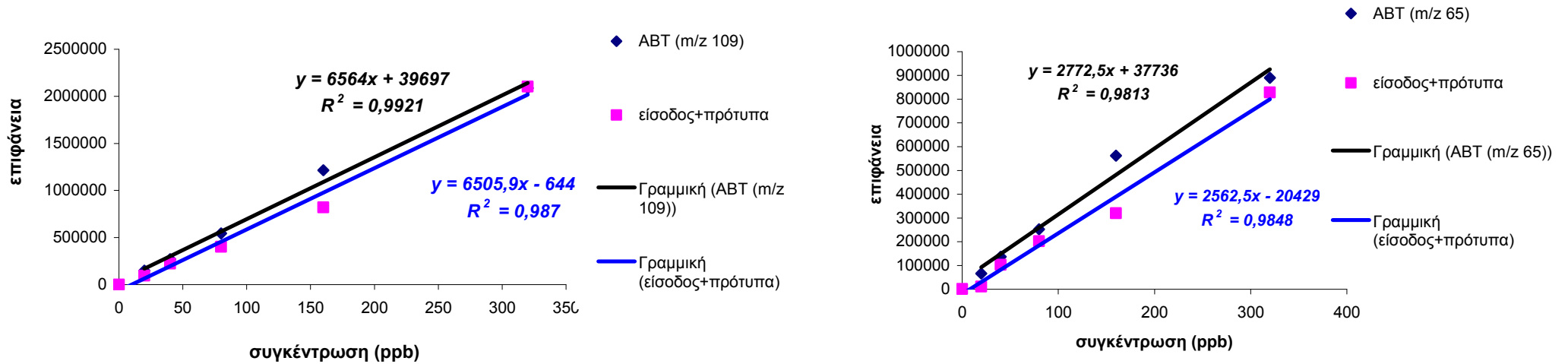
Μελέτη ύπαρξης παρεμποδίσεων μήτρας και υπολογισμός ποσότητας με τη μέθοδο γνωστής προσθήκης

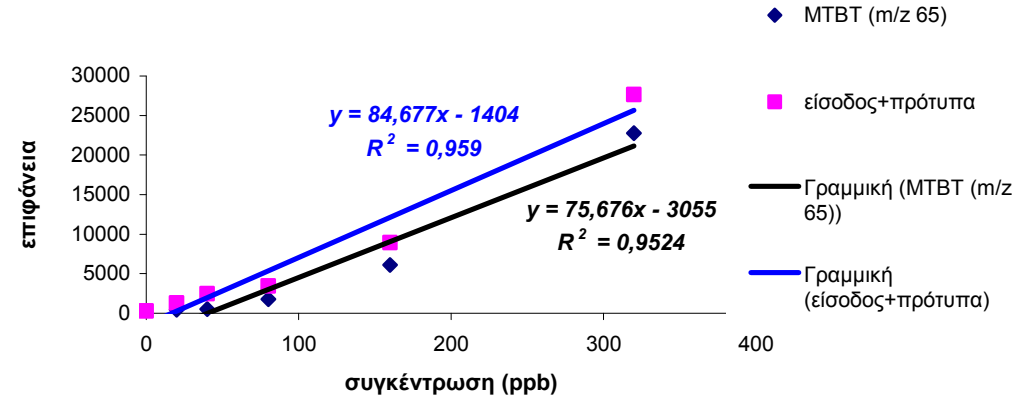
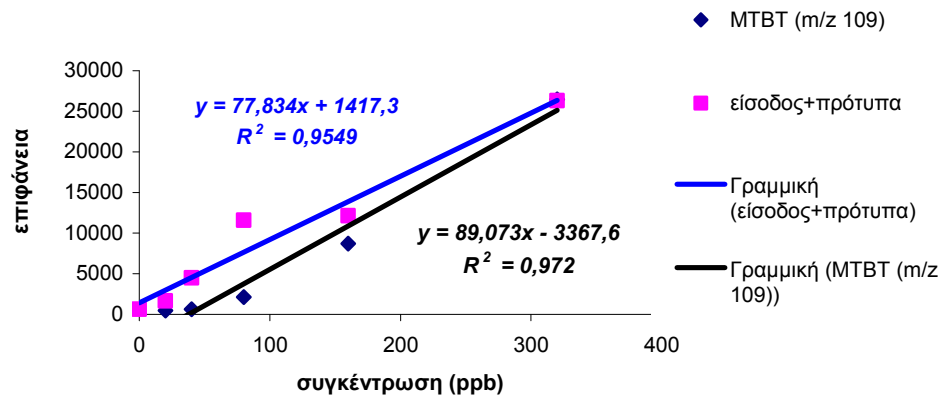
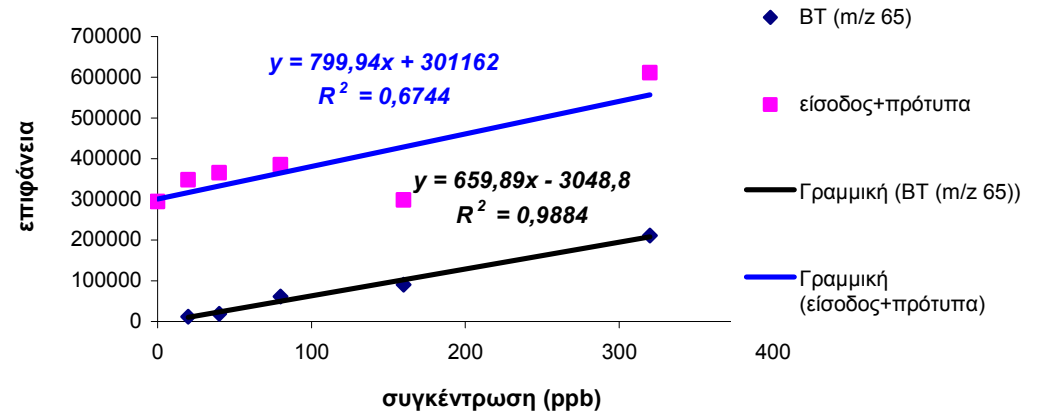
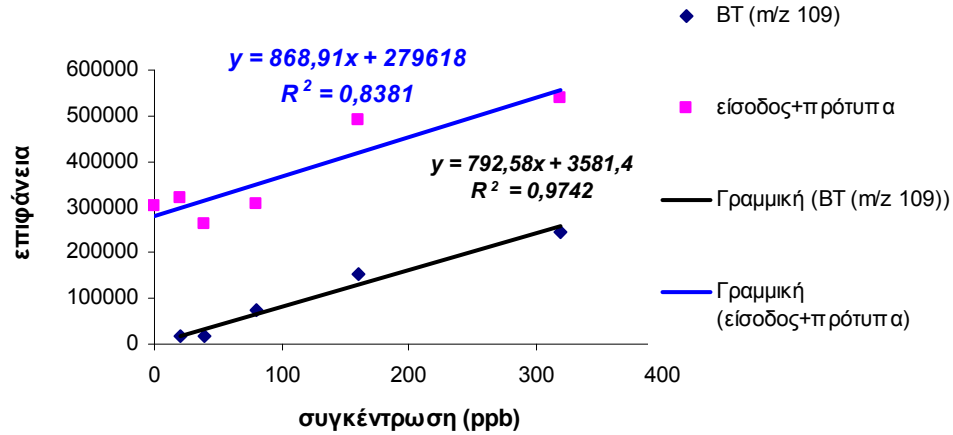


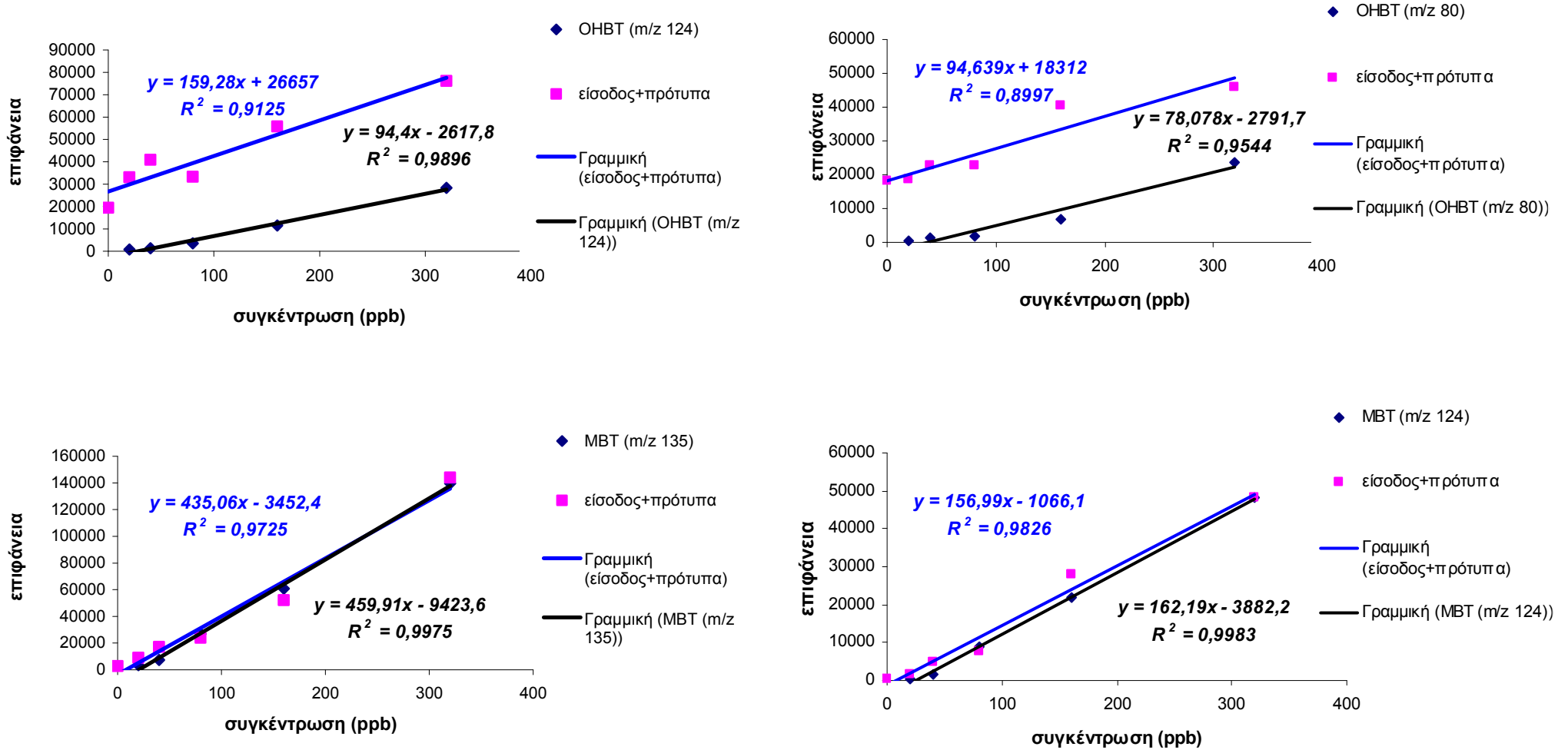




Σχήμα 2Α-1: Μελέτη ύπαρξης παρεμποδίσεων μήτρας δείγματος εξόδου (εκροή) του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου







Σχήμα 2Α-2: Μελέτη ύπαρξης παρεμποδίσεων μήτρας δείγματος εισόδου (εισορή) του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου

Β. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων για τον έλεγχο παρεμποδίσεων της μήτρας του δείγματος

➤ BT (m/z 65)

Πίνακας 2B-1 : Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του BT(m/z 65) για τον έλεγχο παρεμποδίσεων μήτρας.

	BT (m/z 65)	Εισροή BT (m/z 65)	Εκροή BT (m/z 65)
Βέλτιστες τιμές			
Κλίση	659.9 ± 41.33	799.9 ± 277.9	625.2 ± 32.80
Y-σημείο τομής	-3049 ± 6827	301200 ± 41910	34860 ± 4945
X-σημείο τομής	4,62	-376,5	-55,76
1/κλίση	0,001515	0,00125	0,001599
95% Διάστημα εμπιστοσύνης			
Κλίση	528.4 ως 791.4	28.38 ως 1572	534.2 ως 716.3
Y-σημείο τομής όταν X=0.0	-24770 ως 18670	184800 ως 417500	21130 ως 48590
X-σημείο τομής όταν Y=0.0	-33.58 ως 32.94	-13430 ως -128.8	-87.87 ως -30.54
Ουσιαστική εφαρμογή			
r ²	0,9884	0,6744	0,9891
Sy.x	10080	74750	8822
Είναι η κλίση σημαντικά μη μηδενική:			
F	254,9	8,283	363,3
DFn, DFd	1.000, 3.000	1.000, 4.000	1.000, 4.000
P τιμή	0,0005	0,0451	< 0.0001
Απόκλιση από το μηδέν:	σημαντική	σημαντική	σημαντική
Δεδομένα			
Αριθμός τιμών στον άξονα X	5	6	6
Συνολικός αριθμός δεδομένων	5	6	6
Τιμή που δεν υπάρχει	1	0	0

Εκτιμώντας την P τιμή, χρησιμοποιώντας F-τεστ, ελέγχεται κατά πόσο οι εξισώσεις είναι στατιστικά σημαντικές. Αν η P τιμή είναι μικρότερη του 0,05 τότε η ευθεία είναι στατιστικά σημαντική. Στον Πίνακα 1B-1 παρατηρείται ότι και στις τρεις εξισώσεις η P τιμή είναι μικρότερη του 0,05.

Το υπόλοιπο, για τις εξισώσεις του BT (m/z 65) παρουσιάζονται στον Πίνακα 1B-2

Πίνακας 2B-2 : Υπόλοιπο (residual) των ευθειών για το BT (m/z 65)

Συγκέντρωση (ppb)	BT (m/z 65)	Εισροή BT (m/z 65)	Εκροή BT (m/z 65)
0		-6509,543	-3798
20	1269,05	30946,56	-6374,323
40	-4282,171	31786,67	10137,35
80	11376,89	19826,88	7590,709
160	-11951	-130372,7	-9578,581
320	3587,233	54322,14	2022,839

Για να απαντηθεί το ερώτημα κατά πόσο επιδρά ή όχι η μήτρα στο δείγμα θα πρέπει να ελεγχθεί κατά πόσο οι κλίσεις είναι σημαντικά διαφορετικές. Αρχικά λοιπόν θα ελεγχθούν οι κλίσεις των προτύπων για το μοριακό ιόν m/z 65 με την καμπύλη εισόδου (εισροή) του βιολογικού. Υπολογίζεται η P τιμή, χρησιμοποιώντας F τεστ με DF_n οι βαθμοί ελευθερίας του αριθμητή και DF_d οι βαθμοί ελευθερίας του παρανομαστή.

Αν η P τιμή είναι μεγαλύτερη από 0,05 οι γραμμές είναι σχεδόν παράλληλες ή ίδιες, συνεπώς δεν υπάρχει παρεμπόδιση μήτρας.

Η P τιμή για τις εξισώσεις $y = 659,89x - 3048,8$ και $y = 799,94x + 301162$ υπολογίστηκε 0,6699, με χρήση F τεστ (F = 0,197894. DF_n=1 DF_d=7), και είναι μεγαλύτερη του 0,05 συνεπώς οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές.

Δεδομένου ότι οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές, είναι δυνατό να υπολογιστεί μια κλίση για όλα τα στοιχεία. Η ενιαία κλίση είναι ίση με 736,721. Πάλι χρησιμοποιώντας F τεστ (F = 95,2208. DF_n=1 DF_d=8) υπολογίζεται μια δεύτερη P τιμή που ξεετάζει τη μηδενική υπόθεση ότι οι γραμμές είναι ίδιες. Η P τιμή είναι μικρότερη του 0,0001 άρα συμπεραίνεται ότι δεν υπάρχει μόνο μια εξίσωση για όλα τα δεδομένα. Άρα, οι ευθείες θεωρούνται σχεδόν παράλληλες, συνεπώς δεν υφίσταται παρεμπόδιση μήτρας.

Στη συνέχεια θα ελεγχθεί η καμπύλη προτύπων για το μοριακό ιόν m/z 65 με την καμπύλη εξόδου (εκροή) του βιολογικού καθαρισμού. Η εξίσωση της γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας διάφορες συγκεντρώσεις προτύπων, όπως ήδη προαναφέρθηκε, για το BT (m/z 65) είναι $y = 659,89x - 3048,8$ ενώ η εξίσωση του δείγματος της εκροής του βιολογικού καθαρισμού κάνοντας εμβολιασμό με πρότυπα είναι $y = 625,22x + 34860$. Η P τιμή για τις εξισώσεις αυτές υπολογίστηκε με χρήση F τεστ :

- F = 0,445796. DF_n=1 DF_d=7
P=0,5257

Συνεπώς, οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές. Δεδομένου ότι οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές, είναι δυνατό να υπολογιστεί μια κλίση για όλα τα στοιχεία. Η ενιαία κλίση είναι ίση με 640,866. Πάλι χρησιμοποιώντας F τεστ ($F = 37,9836$. $DFn=1$ $DFd=8$) υπολογίζεται μια δεύτερη P τιμή που εξετάζει τη μηδενική υπόθεση ότι οι γραμμές είναι ίδιες.

Η P τιμή ισούται με $P=0.0002701$ άρα συμπεραίνεται ότι δεν υπάρχει μόνο μια εξίσωση για όλα τα δεδομένα. Οι ευθείες θεωρούνται σχεδόν παράλληλες, συνεπώς δεν υφίσταται παρεμπόδιση μήτρας για το BT (m/z 65).

➤ **MBT (m/z 135)**

Πίνακας 2B-3 : Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του MBT (m/z 135) για τον έλεγχο παρεμπόδισεων μήτρας.

	MBT (m/z 135)	Εισροή MBT (m/z 135)	Εκροή MBT (m/z 135)
Βέλτιστες τιμές			
Κλίση	459,9 ± 13.18	435,1 ± 36.57	430,4 ± 29,06
Υ-σημείο τομής	-9424 ± 2176	-3452 ± 5514	-4278 ± 4381
Χ-σημείο τομής	20,49	7,936	9,941
1/κλίση	0,002174	0,002299	0,002324
95% Διάστημα εμπιστοσύνης			
Κλίση	418,0 ως 501.8	333,5 ως 536.6	349,7 ως 511,0
Υ-σημείο τομής όταν Χ=0.0	-16350 ως -2499	-18760 ως 11860	-16440 ως 7884
Χ-σημείο τομής όταν Υ=0.0	5,828 ως 33,42	-32,90 ως 37,78	-21,17 ως 34,26
Ουσιαστική εφαρμογή			
r^2	0,9975	0,9725	0,9821
$Sy.x$	3214	9837	7815
Είναι η κλίση σημαντικά μη μηδενική;			
F	1218	141,5	219,4
DFn, DFd	1,000, 3,000	1,000, 4,000	1,000, 4,000
P τιμή	< 0.0001	0,0003	0,0001
Απόκλιση από το μηδέν;	σημαντική	σημαντική	σημαντική
Δεδομένα			
Αριθμός τιμών στον άξονα Χ	5	6	6
Συνολικός αριθμός δεδομένων	5	6	6
Τιμή που δεν υπάρχει	1	0	0

Πίνακας 2B-4 : Υπόλοιπο (residual) των ευθειών για το MBT (m/z 135)

Συγκέντρωση (ppb)	MBT (m/z 135)	Εισροή MBT (m/z 135)	Εκροή MBT (m/z 135)
0		6229,429	4761,372
20	3718,909	3839,217	4229,042
40	-1580,266	3218,005	2979,711
80	-577,1156	-7452,419	-9634,948
160	-3341,814	-14110,27	-8214,269
320	1780,288	8276,037	5879,092

Για να απαντηθεί το ερώτημα κατά πόσο επιδρά ή όχι η μήτρα στο δείγμα θα πρέπει να ελεγχθεί όπως προηγούμενα, κατά πόσο οι κλίσεις είναι σημαντικά διαφορετικές. Αρχικά λοιπόν θα ελεγχθούν οι κλίσεις των προτύπων για το μοριακό ιόν m/z 135 του MBT με την καμπύλη εισόδου (εισροή) του βιολογικού. Υπολογίζεται η P τιμή, χρησιμοποιώντας F τεστ με DF_n οι βαθμοί ελευθερίας του αριθμητή και DF_d οι βαθμοί ελευθερίας του παρανομαστή.

Η P τιμή για τις εξισώσεις $y = 459,91x - 9423,6$ και $y = 435,06x - 3452,4$ υπολογίστηκε 0,5794, με χρήση F τεστ ($F = 0,337616$, $DF_n=1$ $DF_d=7$), και είναι μεγαλύτερη του 0,05 συνεπώς οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές.

Δεδομένου ότι οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές, είναι δυνατό να υπολογιστεί μια κλίση για όλα τα στοιχεία. Η ενιαία κλίση είναι ίση με 446,277. Πάλι χρησιμοποιώντας F τεστ ($F = 0,480933$, $DF_n=1$ $DF_d=8$) υπολογίζεται μια δεύτερη P τιμή που εξετάζει τη μηδενική υπόθεση ότι οι γραμμές είναι ίδιες. Η P τιμή υπολογίζεται 0,5076, τιμή υψηλή συνεπώς δεν υπάρχει δεδομένο ότι οι εξισώσεις είναι διαφορετικές.

Στη συνέχεια θα ελεγχθεί η καμπύλη προτύπων για το μοριακό ιόν m/z 135 με την καμπύλη εξόδου (εκροή) του βιολογικού καθαρισμού. Η εξίσωση της γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας διάφορες συγκεντρώσεις προτύπων, όπως ήδη προαναφέρθηκε, για το MBT (m/z 135) είναι $y = 459,91x - 9423,6$ ενώ η εξίσωση του δείγματος της εκροής του βιολογικού καθαρισμού κάνοντας εμβολιασμό με πρότυπα είναι $y = 430,37x - 4278,4$. Η P τιμή για τις εξισώσεις αυτές υπολογίστηκε με χρήση F τεστ :

- $F = 0,724647$. $DF_n=1$ $DF_d=7$
 $P=0,4228 > 0,05$

Συνεπώς, μπορούμε να διεξάγουμε το συμπέρασμα ότι οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές.

Δεδομένου ότι οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές, είναι δυνατό να υπολογιστεί μια κλίση για όλα τα στοιχεία. Η ενιαία κλίση είναι ίση με 443,702. Πάλι χρησιμοποιώντας F τεστ ($F = 0,219961$, $DFn=1$ $DFd=8$) υπολογίζεται μια δεύτερη P τιμή που εξετάζει τη μηδενική υπόθεση ότι οι γραμμές είναι ίδιες.

Η P τιμή ισούται με $P=0,6516$, τιμή υψηλή, συνεπώς δεν μπορεί να απορριφθεί η μηδενική υπόθεση, οπότε, δεν υπάρχει δεδομένο ότι οι εξισώσεις είναι διαφορετικές.

➤ **MBT (m/z 124)**

Πίνακας 2B-5 : Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του MBT (m/z 124) για τον έλεγχο παρεμποδίσεων μήτρας.

	MBT (m/z 124)	Εισροή MBT (m/z 124)	Εκροή MBT (m/z 124)
Βέλτιστες τιμές			
Κλίση	162,2 ± 3,808	157,0 ± 10,44	158,7 ± 6,913
Υ-σημείο τομής	-3882 ± 629,0	-1066 ± 1574	-550,3 ± 1042
Χ-σημείο τομής	23,94	6,791	3,467
1/κλίση	0,006166	0,00637	0,0063
95% Διάστημα εμπιστοσύνης			
Κλίση	150,1 ως 174,3	128,0 ως 186,0	139,5 ως 177,9
Υ-σημείο τομής όταν Χ=0.0	-5884 ως -1881	-5434 ως 3302	-3444 ως 2343
Χ-σημείο τομής όταν Υ=0.0	12,27 ως 34,48	-24,28 ως 31,05	-16,15 ως 20,12
Ουσιαστική εφαρμογή			
r ²	0,9983	0,9826	0,9925
Sy.x	929,1	2807	1859
Είναι η κλίση σημαντικά μη μηδενική:			
F	1814	226,3	527,3
DFn, DFd	1,000, 3,000	1,000, 4,000	1,000, 4,000
P τιμή	< 0,0001	0,0001	< 0,0001
Απόκλιση από το μηδέν:	σημαντική	σημαντική	σημαντική
Δεδομένα			
Αριθμός τιμών στον άξονα Χ	5	6	6
Συνολικός αριθμός δεδομένων	5	6	6
Τιμή που δεν υπάρχει	1	0	0

Πίνακας 2B-6 : Υπόλοιπο (residual) των ευθειών για το MBT (m/z 124)

Συγκέντρωση (ppb)	MBT (m/z 124)	Εισροή MBT (m/z 124)	Εκροή MBT (m/z 124)
0		1325,086	1300,343
20	1211,497	-253,7051	1133,825
40	-994,2137	-341,4958	-2956,693
80	-332,1357	-3655,077	-577,729
160	-33,47984	3905,76	1314,199
320	148,332	-980,5668	-213,9447

Στη συνέχεια ελέγχεται όπως προηγούμενα, κατά πόσο οι κλίσεις είναι σημαντικά διαφορετικές. Αρχικά λοιπόν θα ελεγχθούν οι κλίσεις των προτύπων για το μοριακό ιόν m/z 124 του MBT με την καμπύλη εισόδου (εισροή) του βιολογικού. Υπολογίζεται η P τιμή, χρησιμοποιώντας F τεστ με DF_n οι βαθμοί ελευθερίας του αριθμητή και DF_d οι βαθμοί ελευθερίας του παρανομαστή.

Η P τιμή για τις εξισώσεις $y = 162,19x - 3882,2$ και $y = 156,99x - 1066,1$ υπολογίστηκε 0,6833, με χρήση F τεστ ($F = 0,180966$, $DF_n=1$ $DF_d=7$), και είναι μεγαλύτερη του 0,05 συνεπώς οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές.

Δεδομένου ότι οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές, είναι δυνατό να υπολογιστεί μια κλίση για όλα τα δεδομένα. Η ενιαία κλίση είναι ίση με 159,335. Πάλι χρησιμοποιώντας F τεστ ($F = 3,04749$, $DF_n=1$ $DF_d=8$) υπολογίζεται μια δεύτερη P τιμή που εξετάζει τη μηδενική υπόθεση ότι οι γραμμές είναι ίδιες. Η P τιμή υπολογίζεται 0,119, τιμή υψηλή συνεπώς δεν υπάρχει δεδομένο ότι οι εξισώσεις είναι διαφορετικές.

Στη συνέχεια θα ελεγχθεί η καμπύλη προτύπων για το μοριακό ιόν m/z 124 με την καμπύλη εξόδου (εκροή) του βιολογικού καθαρισμού. Η εξίσωση της γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας διάφορες συγκεντρώσεις προτύπων, όπως ήδη προαναφέρθηκε, για το MBT (m/z 124) είναι $y = 162,19x - 3882,2$ ενώ η εξίσωση του δείγματος της εκροής του βιολογικού καθαρισμού κάνοντας εμβολιασμό με πρότυπα είναι $y = 158,73x - 550,34$. Η P τιμή για τις εξισώσεις αυτές υπολογίστηκε με χρήση F τεστ :

- $F = 0,166939$, $DF_n=1$ $DF_d=7$
 $P=0,6951 > 0,05$

Συνεπώς, μπορούμε να διεξάγουμε το συμπέρασμα ότι οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές.

Δεδομένου ότι οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές, είναι δυνατό να υπολογιστεί μια κλίση για όλα τα στοιχεία. Η ενιαία κλίση είναι ίση με 160,288. Πάλι χρησιμοποιώντας F τεστ ($F = 11,0857$, $DFn=1$ $DFd=8$) υπολογίζεται μια δεύτερη P τιμή που εξετάζει τη μηδενική υπόθεση ότι οι γραμμές είναι ίδιες.

Η P τιμή ισούται με $P=0,01039$, άρα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει μόνο μια εξίσωση για όλα τα δεδομένα. Οι ευθείες θεωρούνται σχεδόν παράλληλες, συνεπώς δεν υφίσταται παρεμπόδιση μήτρας για το MBT (m/z 124).

➤ **OHBT (m/z 124)**

Πίνακας 2B-7 : Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του OHBT (m/z 124) για τον έλεγχο παρεμποδισμών μήτρας.

	OHBT (m/z 124)	Εισροή OHBT (m/z 124)	Εκροή OHBT (m/z 124)
Βέλτιστες τιμές			
Κλίση	94,40 ± 5,577	159,3 ± 24,66	73,16 ± 8,781
Υ-σημείο τομής	-2618 ± 921,2	26660 ± 3718	1347 ± 1324
Χ-σημείο τομής	27,73	-167,4	-18,41
1/κλίση	0,01059	0,006278	0,01367
95% Διάστημα εμπιστοσύνης			
Κλίση	76,65 ως 112,1	90,82 ως 227,7	48,79 ως 97,54
Υ-σημείο τομής όταν Χ=0,0	-5549 ως 313,4	16330 ως 36980	-2328 ως 5022
Χ-σημείο τομής όταν Υ=0,0	-3,870 ως 52,28	-380,7 ως -76,72	-93,50 ως 26,28
Ουσιαστική εφαρμογή			
r^2	0,9896	0,9125	0,9455
$Sy \cdot x$	1361	6633	2362
Είναι η κλίση σημαντικά μη μηδενική;			
F	286,5	41,71	69,43
DFn, DFd	1,000, 3,000	1,000, 4,000	1,000, 4,000
P τιμή	0,0004	0,003	0,0011
Απόκλιση από το μηδέν?	σημαντική	σημαντική	σημαντική
Δεδομένα			
Αριθμός τιμών στον άξονα Χ	5	6	6
Συνολικός αριθμός δεδομένων	5	6	6
Τιμή που δεν υπάρχει	1	0	0

Πίνακας 2B-8 : Υπόλοιπο (residual) των ευθειών για το ΟΗΒΤ (m/z 124)

Συγκέντρωση (ppb)	ΟΗΒΤ (m/z 124)	Εισροή ΟΗΒΤ (m/z 124)	Εκροή ΟΗΒΤ (m/z 124)
0		-7175,886	-665,2286
20	1488,828	3194,479	-880,5069
40	132,8226	7839,844	-425,7852
80	-1382,188	-6052,426	3978,658
160	-950,7097	3721,034	-2241,455
320	711,2473	-1527,046	234,318

Στη συνέχεια ελέγχεται όπως προηγούμενα, κατά πόσο οι κλίσεις είναι σημαντικά διαφορετικές. Αρχικά λοιπόν θα ελεγχθούν οι κλίσεις των προτύπων για το μοριακό ιόν m/z 124 του ΟΗΒΤ με την καμπύλη εισόδου (εισροή) του βιολογικού. Υπολογίζεται η P τιμή, χρησιμοποιώντας F τεστ με DF_n οι βαθμοί ελευθερίας του αριθμητή και DF_d οι βαθμοί ελευθερίας του παρανομαστή.

Η P τιμή υπολογίστηκε 0,05481, με χρήση F τεστ (F = 5,30045, DF_n=1 DF_d=7), και είναι λίγο μεγαλύτερη του 0,05 συνεπώς οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές.

Δεδομένου ότι οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές, είναι δυνατό να υπολογιστεί μια κλίση για όλα τα δεδομένα. Η ενιαία κλίση είναι ίση με 129,994. Πάλι χρησιμοποιώντας F τεστ (F = 91,3943, DF_n=1 DF_d=8) υπολογίζεται μια δεύτερη P τιμή που εξετάζει τη μηδενική υπόθεση ότι οι γραμμές είναι ίδιες. Η P τιμή υπολογίζεται μικρότερη του 0,0001, άρα συμπεραίνεται ότι δεν υπάρχει μόνο μια εξίσωση για όλα τα δεδομένα. Άρα, οι ευθείες θεωρούνται σχεδόν παράλληλες, συνεπώς δεν υφίσταται παρεμπόδιση μήτρας.

Στη συνέχεια θα ελεγχθεί η καμπύλη προτύπων για το μοριακό ιόν m/z 124 με την καμπύλη εξόδου (εκροή) του βιολογικού καθαρισμού. Η P τιμή για τις εξισώσεις αυτές υπολογίστηκε με χρήση F τεστ :

- F = 3,69958, DF_n=1 DF_d=7
P=0,09584>0,05

Συνεπώς, μπορούμε να διεξάγουμε το συμπέρασμα ότι οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές.

Δεδομένου ότι οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές, είναι δυνατό να υπολογιστεί μια κλίση για όλα τα στοιχεία. Η ενιαία κλίση είναι ίση με 82,7502. Πάλι χρησιμοποιώντας F τεστ (F = 1,18858, DF_n=1 DF_d=8) υπολογίζεται μια δεύτερη P τιμή που εξετάζει τη μηδενική υπόθεση ότι οι γραμμές είναι ίδιες.

Η Ρ τιμή υπολογίζεται 0,3074, τιμή υψηλή συνεπώς δεν υπάρχει δεδομένο ότι οι εξισώσεις είναι διαφορετικές.

➤ **ΟΗΒΤ (m/z 80)**

Πίνακας 2B-9 : Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του ΟΗΒΤ (m/z 80) για τον έλεγχο παρεμποδισμων μήτρας.

	ΟΗΒΤ (m/z 80)	Εισροή ΟΗΒΤ (m/z 80)	Εκροή ΟΗΒΤ (m/z 80)
Βέλτιστες τιμές			
Κλίση	78,08 ± 9,849	94,64 ± 15,80	75,73 ± 6,663
Υ-σημείο τομής	-2792 ± 1627	18310 ± 2383	254,1 ± 1005
Χ-σημείο τομής	35,76	-193,5	-3,355
1/κλίση	0,01281	0,01057	0,01321
95% Διάστημα εμπιστοσύνης			
Κλίση	46,74 ως 109,4	50,77 ως 138,5	57,23 ως 94,22
Υ-σημείο τομής όταν Χ=0.0	-7968 ως 2384	11700 ως 24930	-2535 ως 3043
Χ-σημείο τομής όταν Υ=0.0	-44,98 ως 82,60	-459,1 ως -90,31	-49,28 ως 29,03
Ουσιαστική εφαρμογή			
r ²	0,9544	0,8997	0,97
Sy.x	2403	4250	1792
Είναι η κλίση σημαντικά μη μηδενική:			
F	62,85	35,87	129,2
DFn, DFd	1,000, 3,000	1,000, 4,000	1,000, 4,000
P τιμή	0,0042	0,0039	0,0003
Απόκλιση από το μηδέν?	σημαντική	σημαντική	σημαντική
Δεδομένα			
Αριθμός τιμών στον άξονα Χ	5	6	6
Συνολικός αριθμός δεδομένων	5	6	6
Τιμή που δεν υπάρχει	1	0	0

Πίνακας 2B-10 : Υπόλοιπο (residual) των ευθειών για το ΟΗΒΤ (m/z 80)

Συγκέντρωση (ppb)	ΟΗΒΤ (m/z 80)	Εισροή ΟΗΒΤ (m/z 80)	Εκροή ΟΗΒΤ (m/z 80)
0		-330,4286	870,9429
20	1838,176	-1619,217	249,4378
40	982,623	609,9954	512,9327
80	-1544,983	-3050,581	-6,077419
160	-2848,696	7205,267	-3098,098
320	1572,88	-2815,037	1470,862

Ελέγχονται οι κλίσεις των προτύπων για το μοριακό ιόν m/z 80 του ΟΗΒΤ με την καμπύλη εισόδου (εισροή) του βιολογικού. Υπολογίζεται η P τιμή, χρησιμοποιώντας F τεστ. Η P τιμή υπολογίστηκε 0,4304, με χρήση F τεστ ($F = 0,699937$, $DFn=1$ $DFd=7$), και είναι μεγαλύτερη του 0,05 συνεπώς οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές.

Δεδομένου ότι οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές, είναι δυνατό να υπολογιστεί μια κλίση για όλα τα δεδομένα. Η ενιαία κλίση είναι ίση με 87,1633. Πάλι χρησιμοποιώντας F τεστ ($F = 116,152$, $DFn=1$ $DFd=8$) υπολογίζεται μια δεύτερη P τιμή που εξετάζει τη μηδενική υπόθεση ότι οι γραμμές είναι ίδιες. Η P τιμή υπολογίζεται μικρότερη του 0,0001, άρα συμπεραίνεται ότι δεν υπάρχει μόνο μια εξίσωση για όλα τα δεδομένα. Άρα, οι ευθείες θεωρούνται σχεδόν παράλληλες, συνεπώς δεν υφίσταται παρεμπόδιση μήτρας.

Στη συνέχεια θα ελεγχθεί η καμπύλη προτύπων για το μοριακό ιόν m/z 80 με την καμπύλη εξόδου (εκροή) του βιολογικού καθαρισμού. Η P τιμή για τις εξισώσεις αυτές υπολογίστηκε με χρήση F τεστ :

- $F = 0,0419323$, $DFn=1$ $DFd=7$
 $P=0,8436 > 0,05$

Συνεπώς, μπορούμε να διεξάγουμε το συμπέρασμα ότι οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές.

Δεδομένου ότι οι κλίσεις δεν είναι σημαντικά διαφορετικές, είναι δυνατό να υπολογιστεί μια κλίση για όλα τα στοιχεία. Η ενιαία κλίση είναι ίση με 76,7871. Πάλι χρησιμοποιώντας F τεστ ($F = 5,49205$, $DFn=1$ $DFd=8$) υπολογίζεται μια δεύτερη P τιμή που εξετάζει τη μηδενική υπόθεση ότι οι γραμμές είναι ίδιες.

Η P τιμή υπολογίζεται 0,04716, συμπεραίνεται λοιπόν οι ευθείες είναι σχεδόν παράλληλες, συνεπώς δεν υφίσταται παρεμπόδιση μήτρας.