

Καλοπέτρη Μαρία
Χημικός

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΟΙΝΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΙΤΗ ΤΗΣ ΧΛΩΡΑΛΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ 1,3-ΔΙΧΛΩΡΟ-2-ΠΡΟΠΑΝΟΛΗΣ ΣΤΟ ΠΟΣΙΜΟ ΝΕΡΟ ΜΕ ΤΗ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ – ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ.

COMMON METHOD DEVELOPMENT FOR THE DETERMINATION OF CHLORAL HYDRATE AND 1,3-DICHLORO-2-PROPANOL IN DRINKING WATER BY COMBINED GAS CHROMATOGRAPHY - MASS SPECTROMETRY.

Μυτιλήνη 2009

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΙΓΑΙΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΠΟΛΙΤΙΚΗ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ

Επιβλέπουσα

Καλαντζή Όλγα-Ιωάννα

Λέκτορας τμήματος Περιβάλλοντος

Πανεπιστημίου Αιγαίου

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γατίδου Γεωργία

Διδάσκουσα Π.Δ. 407/80 Τμήματος Περιβάλλοντος

Πανεπιστημίου Αιγαίου

Καλαντζή Όλγα-Ιωάννα

Λέκτορας Τμήματος Περιβάλλοντος

Πανεπιστημίου Αιγαίου

Νικολάου Νατάσα

Λέκτορας Τμήματος Επιστημών της Θάλασσας

Πανεπιστημίου Αιγαίου

Μυτιλήνη 2009

Αφιερώνεται στους γονείς μου.

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εντάσσεται στο ευρύτερο πεδίο διαπίστευσης του Εργαστηρίου Ελέγχου Ποιότητας Υδάτων και Αέρα. Αποσκοπεί στην ανάπτυξη κοινής μεθόδου προσδιορισμού δυο χημικών ουσιών που αποτελούν ουσίες προτεραιότητας για την Ε.Ε. Οι ουσίες είναι ο υδρίτης της χλωράλης, CH και η 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη, 1,3-DCP. Πρόσφατα, οι δυο ουσίες απέκτησαν ερευνητικό ενδιαφέρον, λόγω της παρουσίας τους στο πόσιμο νερό ως παραπροϊόντα των διεργασιών απολύμανσης, κυρίως, στο σύστημα υδροδότησης (Καναδάς, Αυστρία, Ελλάδα). Η πειραματική διαδικασία διεξήχθη στα εργαστήρια «Χρωματογραφία Μάζας» και «Προκατεργασία Δειγμάτων του Εργαστηρίου».

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στην κ. Καλαντζή Όλγα-Ιωάννα, λέκτορα του Πανεπιστημίου Αιγαίου για την ανάθεση της εν λόγω πτυχιακής και τη συνεχή καθοδήγησή της.

Ευχαριστώ τον κ. Λέκκα Θεμιστοκλή, καθηγητή και υπεύθυνο του εργαστηρίου Ελέγχου Ποιότητας Υδάτων και Αέρα, την κ. Γατίδου, διδάσκουσα Π.Δ. 407/80, την κ. Αλούπη, τον κ. Ατσικμπάση και τον κ. Καραντανέλη, μέλη Ε.Τ.Ε.Π και Ε.Ε.ΔΙ.Π.

Ευχαριστώ τον Πέτσα Α., Περιβαλλοντολόγο, τη Τσιούμα Β. και το Σαμαρά Β, υποψήφιους διδάκτορες για την πολύτιμη βοήθειά και τις συμβουλές τους.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κ. Σιάνο Σ. τεχνικό της εταιρίας Hellamco, για την ανεκτίμητη βοήθεια και τις συμβουλές του.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ είναι το ελάχιστο που μπορώ να πω στο Δημήτρη για την πολύτιμη φιλία του, την πολύπλευρη βοήθεια και συμπαράστασή του κατά τη διάρκεια της άψογης συνεργασίας μας.

Θερμά ευχαριστώ τα αδέρφια μου, Νίκο και Θεώνη, τον Απόστολο και τους φίλους για τη στήριξη που μου προσέφεραν.

Με όλη την αγάπη μου αφιερώνω την εν λόγω εργασία στους γονείς μου, Στέργιο και Κωνσταντίνα, ως ένα ελάχιστο δείγμα της ευγνωμοσύνης μου για την αμέριστη αγάπη και ολόπλευρη συμπαράστασή τους, όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

GC-MS	Συνδυασμός αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματοσκοπία μάζας
GC/ECD	Συνδυασμός αέριας χρωματογραφία με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
LC-MS	Συνδυασμένη τεχνική υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματοσκοπία μάζας
HS	Δειγματοληψία υπερκείμενης φάσης
IR	Φασματοσκοπία υπερύθρου
MS	Φασματοσκοπία μαζών
MSD	Mass Selective Detector
MS/MS	Συζευγμένη φασματομετρία μαζών
LLE	Liquid-liquid extraction
EI	Πηγή ηλεκτρονικού ιοντισμού: ιονισμός μορίου με σύγκρουση με ηλεκτρόνιο
CI	Πηγή χημικού ιοντισμού
SCAN	Σάρωση φάσματος σε γνωστή και εκτεταμένη περιοχή θραυσμάτων
SIM	Εκλεκτική παρακολούθηση επιλεγμένων ιόντων
CH	Υδρίτης της χλωράλης
1,3 DCP	1,3-διχλωρο-2-προπανόλη
MCAA	Μονοχλωροξικό οξύ
2,3-DCP	2,3-διχλωρο-1-προπανόλη
3-MCPD	3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη
2-MCPD	2-χλωρο-1,3-προπανοδιόλη
HAAs	Αλογονωμένα οξικά οξέα
THMs	τριαλομεθάνια
MTBE	μεθυλο- <i>tert</i> -βουτυλ-αιθέρας
DCM	διχλωρομεθάνιο
CH ₃ OH	μεθανόλη
E.A.	οξικός αιθυλεστέρας
DDT	παρασιτοκτόνο (διχλωρο-διφαινυλο-τριχλωροαιθάνιο)
NADH	ανηγμένο νικοτιναμίδο αδενινο δινουκλεοτίδιο
NAD ⁺	νικοτιναμίδο αδενινο δινουκλεοτίδιο
He	μόριο χημικού στοιχείου ηλίου
N ₂	Μόριο χημικού στοιχείου αζώτου
O ₃	Όζον
Ar	Αργό

H ₂	υδρογόνο
CH ₄	μεθάνιο
DBPs	παραπροϊόντα απολύμανσης
CDBP	χλωριωμένα παραπροϊόντα απολύμανσης
acid-HVP	όξινα υδρολυμένες φυτικές πρωτεΐνες
PAHs	Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
RSD	σχετική τυπική απόκλιση
TDI	ημερήσια ανεκτή πρόσληψη
IUPAC	Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας
EPA	Environmental Protection Agency
FDA	Food and Drug Administration
IARC	International Agency for Research on Cancer
NIST	National Institute of Standards and Technology
NTP	National Toxicology Program
EINECS	European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances
DBPR	Disinfection Byproducts Rule
MCL	Maximum contaminant level
MCLG	Maximum contaminant level goal
CEN	European Committee for Standardization
GAC	Κοκκώδης Ενεργοποιημένος Άνθρακας
DWI	Drinking Water Inspectorate
i.d	Εσωτερική διάμετρος τριχοειδούς στήλης
M _r	Σχετική μοριακή μάζα
eV	Ηλεκτρονιοβολτ, μονάδα μέτρησης ενέργειας ηλεκτρονίου
m/z	λόγος μάζας/φορτίο
σ.ζ.	σημείο ζέσεως
Torr	μονάδα μέτρησης της πίεσης (Torricelli)
rpm	μονάδα μέτρησης, στροφές ανά 1 λεπτό
μL	1/1000 του εκατοστόλιτρου (1μL = 10 ⁻³ ml)
μM	10 ⁻³ Molarity, συγκέντρωση εκφρασμένη σε μmole ουσίας ανά 1 lt διαλύματος
P _{ατμ}	τάση ατμών
ppm	parts per million
ppb	parts per billion
mg	milligram (1 mg = 10 ⁻³ g)
μg	microgram (1 μg = 10 ⁻⁶ g)

ng	nanogram (1 ng = 10 ⁻⁹ g)
pg	picogram (1 pg = 10 ⁻¹² g)
bw	by weight
psi	1 pound per square inch

Περίληψη

Η Ε.Ε. βρίσκεται σε επαγρύπνηση αναφορικά με τα αναρίθμητα οργανικά παραπροϊόντα χλωρίωσης στο πόσιμο νερό. Δυο από τις ουσίες που ανήκουν στην εν λόγω κατηγορία, ο υδρίτης της χλωράλης και η 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη, αποτελούν θέμα έρευνας της παρούσας εργασίας. Παλαιότερα, ο υδρίτης της χλωράλης χρησιμοποιήθηκε ως αναισθητικό. Ομοίως με τον υδρίτη της χλωράλης κι η 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη σχηματίζεται κατά τη διεργασία απολύμανσης στο σύστημα υδροδότησης πόσιμου νερού. Σκευάσματα που περιέχουν την 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη σε ποσότητες περισσότερες από 0,1% θα πρέπει να αναφέρονται στην ετικέτα ως τοξικά και καρκινογόνα, σύμφωνα με την οδηγία 91/155/EEC. Η εν λόγω εργασία αποσκοπεί στην ανάπτυξη μιας μεθόδου που να καθιστά εφικτή την ανίχνευση των δυο ουσιών σε διαλύτη MTBE και την εύρεση των ορίων ανίχνευσης (LOD, LOQ) όταν συνυπάρχουν σε ένα δείγμα. Τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν περιείχαν και τις δυο ουσίες σε κοινό διάλυμα. Εφαρμόστηκε η συνδυασμένη τεχνική ιχνοανάλυσης GC-MS. Αποτελεί μια τεχνική άριστου διαχωρισμού με ικανότητα ταυτοποίησης που παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης σε χαμηλά επίπεδα (ppb, ppt). Η μέθοδος ταυτόχρονου προσδιορισμού που αναπτύχθηκε έχει όρια ανίχνευσης για τον υδρίτη της χλωράλης 4,8 ppb και για την 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη 2,2 ppb. Με απώτερο στόχο τη βέλτιστη ανάκτηση των ουσιών έγιναν βελτιώσεις στα στάδια της προετοιμασίας δειγμάτων.

Abstract

EC is in alert because of the presence of numerous DBPs in water. Studies have focused on chloral hydrate and 1,3-dichloro-2-propanol, considering the impacts of toxicity to humans. This study aimed to develop a combined analytical method that would determine chloral hydrate and 1,3-dichloro-2-propanol in water samples. The concept was to prepare common solutions of the two substances, with GC-MS being the applied method. Regarding the analytical procedure, the experiments were not only based in previously published methods, but were also developed with regards to sample preparation and instrument conditions. Tests included preparation of standard solutions. The so-called “samples” solutions, which were solutions containing the two substances in known concentrations, were also diluted. Moreover, a calibration curve was created. The new method which is rapid and sensitive, has limit of detection (LOD) 4,8 ppb for chloral hydrate and 2,2 ppb for 1,3-dichloro-2-propanol. Also, optimization improving the recoveries of the method, during the experimental procedure, has been done.

1.4.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες.....	18
1.4.4 Οδηγίες με αναφορές στην 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη.....	18
1.4.5 Σχηματισμός	18
1.4.6 Χρήσεις	19
1.4.7 Στοιχεία τοξικότητας.....	20
1.4.8 Κινητικότητα και μεταβολισμός	22
1.4.9 Περιβάλλον.....	23
1.4.9.1 Περιβαλλοντική έκθεση	23
1.4.9.2 Διατροφική έκθεση.....	24
1.4.10 Αξιολόγηση επικινδυνότητας.....	24
1.4.11 Αναλυτικές μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού	25
1.5 Χρωματογραφία	26
1.5.1 Γενικά.....	26
1.5.2 Είδη χρωματογραφικών τεχνικών	28
1.5.3 Αρχή χρωματογραφικού διαχωρισμού	28
1.6 Αέρια χρωματογραφία.....	29
1.6.1 Γενικά.....	29
1.6.2 Οργανολογία.....	29
1.6.3 Φέρον αέριο.....	32
1.6.4 Σύστημα εισαγωγής δείγματος.....	33
1.6.5 Εισαγωγή σε τριχοειδείς στήλες.....	33
1.6.6 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα GC.....	36
1.7 Φασματομετρία	36
1.8 Φασματομετρία μαζών	37
1.8.1 Γενικά.....	37
1.8.2 Αρχή λειτουργίας	38
1.8.3 Φασματογράφος μαζών.....	40

1.8.4 Τύποι φασματογράφων μαζών	41
1.8.5 Φάσμα μαζών	42
1.8.6 Ερμηνεία φασμάτων μαζών.....	42
1.8.7 Ερμηνεία των τύπων θραυσματοποίησης στα φάσματα μαζών	43
1.8.8 Μέθοδοι ιοντισμού	44
1.8.9 Τεχνικές συλλογής δεδομένων	44
1.9 Συνδυασμένη τεχνική GC – MS.....	45
1.9.1 Γενικά	45
1.9.2 Οργανολογία.....	46
1.9.3 Εφαρμογές GC – MS.....	48
1.9.3.1 Βιολογικά υγρά	48
1.9.3.2 Ανάλυση τροφίμων	48
1.9.3.3 Περιβαλλοντικά δείγματα	49
1.9.3.4 Προϊόντα προσωπικής περιποίησης	49
Σκοπιμότητα και στόχοι.....	50
2. Πειραματικό μέρος	
2.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	51
2.1.1 Κύριος	51
2.1.2 Βοηθητικός.....	51
2.1.3 Αντιδραστήρια.....	51
2.2 Μέθοδος	54
2.2.1 Γενικά.....	54
2.2.2 Ανάπτυξη μεθόδου	55
2.2.3 Ρυθμίσεις οργάνου.....	56
2.2.4 Παρασκευή διαλυμάτων CH και 1,3-DCP	
2.2.5 Διαλύτης μεθανόλη	58

2.2.6	Θερμοκρασιακά προγράμματα GC	60
2.2.7	Προετοιμασία δειγμάτων και προτύπων	63
2.2.8	Εκχύλιση σε διαλύτες.....	65
2.2.9	Πολλαπλές εκχυλίσεις.....	67
2.2.10	Επιλογή άλατος και μεταβολή της ποσότητάς του.....	69
2.2.11	Κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης	72
2.2.12	Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικού προσδιορισμού.....	74
2.2.13	Εύρεση σχετικής τυπικής απόκλισης	76
2.2.14	Αντικατάσταση υλικού εξοπλισμού.....	77
2.2.15	Διαχείριση αποβλήτων	77
3.	Συζήτηση – Συμπεράσματα.....	78
4.	Βελτίωση μεθόδου.....	79
	Βιβλιογραφία.....	80
	Παράρτημα.....	86

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πρόδηλοι είναι οι λόγοι που επιβάλλουν σήμερα την κατάρτιση και το σχεδιασμό προγραμμάτων ελέγχου ρύπανσης του περιβάλλοντος, τόσο στις πηγές εκπομπής ρύπων, όσο και στους αποδέκτες αυτών. Ρύπανση στο περιβάλλον αναμένεται να καταστήσει επιβλαβές, μεταξύ όλων των άλλων αγαθών, το νερό. Επιτακτική και ζωτικής σημασίας είναι η άσκηση αυστηρότερης νομοθεσίας διότι τελικός αποδέκτης κάθε είδους επιμόλυνσης στο περιβάλλον είναι ο άνθρωπος.

Γενικά, το πόσιμο νερό υποβάλλεται σε εκτενείς ελέγχους για διερεύνηση πιθανής ρύπανσης προερχόμενης από το ευρύ περιβάλλον. Στα πλαίσια παρακολούθησης του νερού πραγματοποιούνται ενδεδειγμένες δειγματοληψίες, προσδιορισμός, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των ρύπων. Οι οριακές ή ανώτατες επιτρεπτές τιμές καθορίζονται νομοθετικά και αποτελούν ουσιαστικό εργαλείο για την προστασία του περιβάλλοντος. Οι κοινοτικές οδηγίες έχουν καταρτίσει πίνακες με αναφορές στις συγκεντρώσεις που ενδέχεται να θέσουν σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία. Η εύρεση των επιβλαβών ορίων βασίζεται κυρίως στην εκτίμηση της τοξικότητας (οικοτοξικολογικά κριτήρια, επιδημιολογικές έρευνες, βιοχημικά πειράματα σε ζώα, κλινικές μελέτες) και της επικινδυνότητας των ρύπων.

Εν τούτοις, τα όρια των συγκεντρώσεων εμφανίζουν τάση ελάττωσης από υψηλές προς χαμηλότερες τιμές. Η κοινοτική οδηγία διαμέσου του WHO, ελάττωσε τη συγκέντρωση της κατευθυντήριας γραμμής της προσδιοριζόμενης ουσίας, CH, από 20 µg/L σε 10 µg/L. Η αναλυτική χημεία στο κάλεσµα για ανίχνευση των ουσιών σε επίπεδα ιχνών αποκρίνεται με καινοτόμα επιτεύγματα, όπως είναι η συνδυασμένη τεχνική GC-MS. Για την 1,3-DCP, η μέγιστη ανεκτή συγκέντρωση που έχει οριστεί από την αυστριακή νομοθεσία ως περιβαλλοντικός στόχος είναι 10 µg/L.

Η εργασία αποτελείται από τέσσερα κεφάλαια. Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση στον υδρίτη της χλωράλης, την 1,3-DCP, τις τεχνικές χρωματογραφία, αέρια χρωματογραφία, φασματομετρία, φασματομετρία μαζών και τη συνδυασμένη τεχνική GC-MS. Τα στοιχεία βρέθηκαν με μηχανισμούς αναζήτησης στο διαδίκτυο όπως scopus, sciencedirect, βιβλιοθήκες πανεπιστημίων. Η αναζήτηση έγινε με εισαγωγή λέξεων – κλειδίων όπως π.χ. method development, DBPs, GC-MS, CH, 1,3-DCP. Επιλέχθηκαν οι εργασίες με συναφές αντικείμενο μελέτης προς το παρόν θέμα. Στο δεύτερο κεφάλαιο αναφέρεται η ανάπτυξη της κοινής μεθόδου προσδιορισμού του CH και της 1,3-DCP. Η μέθοδος πλαισιώθηκε από τα πειραματικά δεδομένα των ευρεθέντων εργασιών. Στη συνέχεια έγινε προσαρμογή των δεδομένων στις επικρατούσες συνθήκες του εργαστηρίου. Στο τρίτο κεφάλαιο παραθέτονται τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τα

πειραματικά ευρήματα. Το τέταρτο κεφάλαιο περιλαμβάνει προτάσεις που αφορούν στη βελτίωση της μεθόδου προσδιορισμού.

Στα πλαίσια διεξαγωγής των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε εκπαίδευση για την εύρυθμη λειτουργία του εργαστηρίου: εισαγωγή στους κανόνες υγιεινής και ασφάλειας του εργαστηρίου (Πρωτόκολλο: «Κανονισμός λειτουργίας και ασφάλειας εργαστηρίων των τομέων περιβαλλοντικής μηχανικής, επιστήμης και διαχείρισης οικοσυστημάτων του τμήματος Περιβάλλοντος»), ορθός χειρισμός εργαστηριακού εξοπλισμού. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε εκπαίδευση στη λειτουργία του οργάνου GC-MS, ζυγού ακριβείας, συσκευή φυγοκέντρωσης, συσκευή παροχής υπερκάθαρου νερού Milli-Q, Milli – RO, κλιβάνου ξήρανσης σκευών, ξήρανση με αέριο άζωτο, τήρηση ημερολογίου ανάλυσης GC-MS. Καταρτήθηκε ο κατάλληλος εργαστηριακός εξοπλισμός (υλικοτεχνική υποδομή), έγινε τροφοδοσία με αναλώσιμη ύλη (χημικά αντιδραστήρια, σκεύη, κ.λπ.) και εξάσκηση στις τεχνικές, δοκιμή νέων τεχνικών.

1.2 ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ

Τα τελευταία χρόνια τα παραπροϊόντα απολύμανσης, DBPs, αποτελούν μια ιδιαίτερη κατηγορία χημικών ενώσεων που προσελκύει το ενδιαφέρον των ερευνητών. Με τον όρο disinfection by-products, DBPs, νοούνται όλα εκείνα τα παραπροϊόντα που παράγονται κατά τις διεργασίες απολύμανσης στο νερό. Πιο συγκεκριμένα, τα υπολείμματα απολυμαντικών, όπως είναι το χλώριο, όζον, διοξείδιο του χλωρίου, χλωραμίνες, αντιδρούν με τη φυσική οργανική ύλη και/ή με τα ιόντα βρωμίου και ιωδίου που υπάρχουν σε πηγές νερού και παράγουν μια σειρά από DBPs (THMs, HAAs). Κατά την αντίδραση του χλωρίου με την περιεχόμενη στο νερό οργανική ύλη είναι δυνατό να προκύψει σειρά οργανικών παραπροϊόντων χλωρίωσης. Η πρώτη κατηγορία DBPs που ανιχνεύτηκε στο νερό ήταν τα τριαλογονοπαράγωγα του μεθανίου, THMs. Περισσότερα από 500 DBPs είναι εκείνα που έχουν ταυτοποιηθεί στο νερό (Koufjovou, 2006). Δυο από αυτές τις ενώσεις, ο υδρίτης της χλωράλης CH και η 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη (1,3-DCP) αποτελούν αντικείμενο έρευνας στην παρούσα εργασία.

1.3 ΥΔΡΙΤΗΣ ΤΗΣ ΧΛΩΡΑΛΗΣ

1.3.1 ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ

Cas Registry No.: 302-17-0

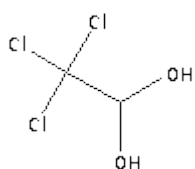
RTECS No: FM8750000

UN No: 2811

EC No: 605-014-00-6

Μοριακός τύπος: $C_2H_3Cl_3O_2$

Σχετική Μοριακή Μάζα: 165,42 g/mole



Εικόνα 1: Προβολή συντακτικού τύπου και στερεοσκοπικό μοριακό μοντέλο του CH στο χώρο.

1.3.2 ΓΕΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Ο υδρίτης της χλωράλης είναι γνωστός και ως 2,2,2-τριχλωρο-1,1-αιθανοδιόλη. Στη φυσική του κατάσταση εμφανίζεται σε στερεή μορφή με άχρωμους, διάφανους ή λευκούς κρυστάλλους, χαρακτηριστική δριμεία, αρωματική οσμή και καυστική γεύση. Σχηματίζεται κατά την αντίδραση των ιόντων χλωρίου με αιθανόλη. Αποσυντίθεται κατά τη θέρμανση του ($>97^{\circ}C$) και εκλύει τοξικούς και ερεθιστικούς ατμούς, όπως είναι το υδροχλώριο. Αντιδρά με ισχυρές βάσεις και παράγεται χλωροφόρμιο. Χρησιμοποιείται ως ηρεμιστικό και υπνωτικό. Ως ηρεμιστικό η συνιστώμενη δόση σε ενήλικες είναι 250 mg τρεις φορές την ημέρα και ως υπνωτικό 500-1000 mg. Η συνιστώμενη δόση σε παιδιά που υποβάλλονται σε ιατρική ή οδοντιατρική επέμβαση είναι 50 έως 100 mg/kg. Μεταβολίζεται, αμέσως, προς τριχλωροαιθανόλη, ουσία που ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για τη φαρμακολογική δράση (EPA).

1.3.3 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Πίνακας 1: Φυσικές ιδιότητες του υδρίτη της χλωράλης

ΦΥΣΙΚΗ ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΤΙΜΗ	ΑΝΑΦΟΡΑ
Σημείο τήξεως	57- 60 °C	Hansch et al., 1995
Σημείο ζέσεως	96-98 °C Αποσυντίθεται	Hansch et al., 1995
Πυκνότητα	1,9 g/ml	WHO, 2000
Πίεση εξάτμισης	2 kPa (25 ⁰ C)	Reynolds & Prasad, 1982 Hansch et al., 1995
Πτητικότητα	Εξατμίζεται κατά την έκθεση στον αέρα	Monographs for pharmaceutical substances, σελίδα 57
Διαλυτότητα στο νερό	9,3 x 10 ⁶ mg/L (25 °C), Πολύ καλή	McEvoy, 1999
Διαλύεται	αιθανόλη, ακετόνη, χλωροφόρμιο	ΕΥΔΑΠ, 2005
Διαλυτότητα σε αιθανόλη	750 g/L	Monographs for pharmaceutical substances, σελίδες 57-58
Συντελεστής κατανομής σε μίγμα οκτανόλης/νερού ως log (K _{ow})	0,99	IPCS, 2000a

1.3.4 ΟΔΗΓΙΕΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΗΣ

Πίνακας 2: Οδηγίες προφύλαξης από τον CH (IPCS, 2000; WHO, 2000)

Τύπος κινδύνου	Οξείς κίνδυνοι /συμπτώματα	Πρόληψη	Πρώτες βοήθειες/μέσα κατάσβεσης
Έκρηξη/πυρκαγιά	Μη εύφλεκτος Εκλύει ερεθιστικούς ή τοξικούς καπνούς		Επιτρέπονται όλα τα μέσα
Έκθεση		Αποφυγή διασποράς της σκόνης	
Εισπνοή	Αταξία, υπνηλία, ναυτία, αναισθησία	Προστασία αναπνοής	Φρέσκος αέρας, ξεκούραση τεχνητή αναπνοή όπου ενδείκνυται
Δέρμα	Ερυθρότητα	Προστατευτικά γάντια	Ξέπλυμα με άφθονο νερό ή ντους
Μάτια	Ερυθρότητα	Προστατευτικά γυαλιά	Αρχικά ξέπλυμα με άφθονο νερό για ορισμένα λεπτά (απομάκρυνση των φακών επαφών με καθαρά χέρια εάν είναι εύκολο) και επίσκεψη σε γιατρό
Κατάποση	Γαστρικός πόνος έμετος	Απαγορεύεται η κατανάλωση τροφίμων και ποτών κατά την εργασία να πλένονται καλά τα χέρια	Ξέπλυμα του στόματος χορήγηση ενεργού άνθρακα σε νερό αναφορά σε γιατρό
Να αποθηκεύεται χωριστά από τις ισχυρές βάσεις, τρόφιμα και τροφοδοσία υλικού			

1.3.5 ΚΥΡΙΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΙ ΧΡΗΣΕΙΣ

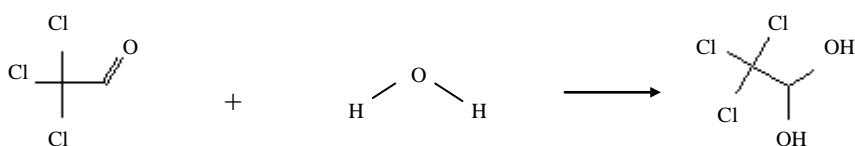
Η εν λόγω ουσία έχει χρησιμοποιηθεί με την ηρεμιστική-υπνωτική ιδιότητά της από τον Liebreich που την εισήγαγε στην κλινική θεραπευτική το 1869 (Henderson *et al.*, 1997). Αποτελεί διαδεδομένο αναισθητικό με ευρεία εφαρμογή αφενός στην ιατρική και παιδιατρική και αφετέρου στην κτηνιατρική [χρησιμοποιείται ως καταπραϋντικό του ΚΝΣ, και ως αναισθητικό (Schmitt *et al.*, 2002)]. Στα βρέφη και στα παιδιά ο υδρίτης της χλωράλης χορηγείται πριν από τις οδοντικές, μικροχειρουργικές και διαγνωστικές επεμβάσεις για να ανακουφίσει πριν την επέμβαση αλλά και για να προκαλέσει ύπνο (Delinsky *et al.*, 2005). Σε πρότερη εργασία υπάρχει αναφορά ότι η ουσία χορηγήθηκε ως ήπιο υπνωτικό (Allegaert *et al.*, 2005). Πρόσθετα, χρησιμοποιείται ως απολυμαντικό, καθαριστικό μετάλλων, σε χημικές συνθέσεις για την παραγωγή συνθετικών ελαστικών ενώ παλαιότερα χρησιμοποιήθηκε για πολεμικό σκοπό ως δηλητηριώδες αέριο (ΕΥΔΑΠ, 2005). Γενικά ο CH χρησιμοποιείται στην οργανική σύνθεση και ειδικά στην παρασκευή χρωμάτων, καθώς επίσης και στην παρασκευή του DDT και του διχλωροξικού οξέος (Νικολάου, 2001).

1.3.6 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ

Ενδέχεται να σχηματιστεί ως παραπροϊόν χλωρίωσης στο νερό που περιέχει πρόδρομα οργανικά μόρια, όπως είναι τα φουλβικά και τα χουμικά οξέα (WHO, 2005).

➤ Κατά την αντίδραση της χλωράλης με το νερό

Η χλωράλη δε διαλύεται στο νερό, αντιθέτως, αντιδρά με αυτό σχηματίζοντας τον υδρίτη της χλωράλης, σύμφωνα με την αντίδραση:



Σχηματισμός του CH από τη χλωράλη (NIST Chemistry WebBook)

➤ Κατά τη διεργασία απολύμανσης στο σύστημα υδροδότησης πόσιμου νερού.

Σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο πόσιμο νερό του Καναδά που είχε κατεργαστεί με χλωριωμένο απολυμαντικό, βρέθηκε CH. Ο CH αναγνωρίστηκε ως το

επικρατέστερο χλωριωμένο παραπροϊόν απολύμανσης, CDBPs (ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 5-60% στο σύνολο των αλογονωμένων ακεταλδεύδων). Παρατηρήθηκε ότι η κατανομή του CH στο σύνολο των CDBPs επηρεάζεται από δυο παράγοντες: το ψυχρό νερό (αυξάνεται) και τον οξονισμό όταν εφαρμόζεται ως πρωτογενής απολύμανση. Υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης παρατηρήθηκαν σε συστήματα όπου εφαρμόστηκε το όζον, πρωτογενώς. Οι εργαστηριακές δοκιμές με ελεγχόμενη χλωρίωση της ακεταλδεύδης και της μεθυλογλυοξάλης σε τυπικές συνθήκες πόσιμου νερού (pH 6,7, 7,6 και 8,8, θερμοκρασία 4 και 21 °C) αποκάλυψαν ότι ο σχηματισμός του CH προέρχεται από την ακεταλδεύδη, αλλά όχι από τη μεθυλογλυοξάλη. Στα συστήματα υδροδότησης πόσιμου νερού, ο σχηματισμός του CH δεν αποδίδεται στην παρουσία της ακεταλδεύδης, αποκλειστικά. Η αντίδραση μεταξύ της ακεταλδεύδης με άτομα χλωρίου είναι αργή και η μετατροπή σε CH είναι περιορισμένη σε τυπικές συνθήκες pH και θερμοκρασίας. Επιπλέον, ο CH υφίσταται υδρόλυση και σχηματίζει χλωροφόρμιο και άλλα αδιευκρίνιστα DBPs υπό αυξημένες συνθήκες pH (Koudjounou *et al.*, 2008).

1.3.7 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Μια σειρά από αναλύσεις έχουν δείξει ότι ο CH είναι γονιδιοτοξικός (Schmitt *et al.*, 2002). Η ουσία είναι ερεθιστική για το δέρμα και τους βλεννογόνους υμένες και προκαλεί, συχνά, γαστρικό πόνο, ναυτία και έμετο (WHO, 2000). Μια οξεία υπερδοσολογία μπορεί να προκαλέσει αταξία, λήθαργο, βαθύ κόμα, καταπόνηση του αναπνευστικού συστήματος, υπόταση και καρδιακή αρρυθμία (WHO, 2000). Υπάρχει ένδειξη ηπατικής φλεγμονής σε ανθρώπους που κινδύνευαν επειδή νόσησαν αλλά επιβίωσαν από τις οξείες υπερδοσολογίες (WHO, 2000). Ωστόσο είναι αμφίβολο αν η ηπατική φλεγμονή προκλήθηκε από την κλινική δοσολογία (WHO, 2000).

Η διαμέσου του στόματος πρόσληψη της ουσίας σε υψηλές δοσολογίες μπορεί ενδεχομένως να προκαλέσει ποικίλες παρενέργειες, όπως γαστρικό ερεθισμό με ναυτία, έμετο και διάρροια, λευκοπενία, ηωσινοφιλία, και σπανίως κετονουρία (WHO, 2005). Μια εκτενής έρευνα στη γενετική τοξικότητα καταλήγει σε ποικίλα αποτελέσματα που δείχνουν ότι ο CH είναι ένα ασθενές μεταλλαξιογόνο και προκαλεί θραύσεις στην αλυσίδα του DNA (WHO, 2000). Προκαλεί ανευπλοειδία σε ένα ευρύ φάσμα ειδών κυττάρων (WHO, 2000). Παρόλη τη μακρά χρήση του στην ιατρική, δεν υπάρχει δημοσιευμένη πληροφορία από ελεγχμένες έρευνες αναφορικά με την τοξικότητα σε ανθρώπους που εκτέθηκαν επί μακρόν (WHO, 2000). Λόγω της πρόσφατης χρήσης του στην παιδιατρική και της εκτεταμένης ανθρώπινης έκθεσης, ο οργανισμός FDA των Η.Π.Α το 1992 απέδωσε στον CH προτεραιότητα για περαιτέρω τοξικολογική εκτίμηση από το NTP (Schmitt *et al.*, 2002).

Στοιχεία καρκινογένεσης στους ανθρώπους δεν ανευρέθηκαν (WHO, 2000). Δυο βιοεκθέσεις σε αρουραίους δεν κατέδειξαν ανάπτυξη όγκων σε κανένα ιστό (WHO, 2000). Τρεις ανεξάρτητες βιοεκθέσεις σε αρσενικά ποντίκια έδειξαν αυξημένα περιστατικά όγκων στο συκώτι (WHO, 2000). Αυτά τα στοιχεία παρέχουν μια ενδεχόμενη ένδειξη καρκινογένεσης στα αρσενικά ποντίκια, αλλά δε θεωρούνται κατάλληλα ώστε να θεσπιστεί εκτίμηση επικινδυνότητας για την ανθρώπινη υγεία (WHO, 2000). Η τιμή κατευθυντήριας γραμμής, βάσει της οδηγίας, είναι 10 µg/L (CMP, 2004).

Ο CH έδωσε αρνητικά αποτελέσματα σε σημεία μεταλλάξεων στα περισσότερα πειράματα με βακτήρια και σε *in vivo* έρευνες ως προς τη δυσλειτουργία των χρωμοσωμάτων. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι μπορεί να επηρεάσει τις δομικές χρωμοσωμικές διαταραχές *in vitro* και *in vivo* (EHC 216, WHO, 2000). Ο CH, σε συγκέντρωση 1 g/L στο πόσιμο νερό, επηρέασε τους όγκους στο συκώτι σε ποντίκια που εκτέθηκαν για 104 εβδομάδες (EHC 216, WHO, 2000). Παρατηρήθηκε ότι προκάλεσε χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε ορισμένα πειράματα *in vitro*, όμως αποδείχτηκε αρνητική όταν εξετάστηκε *in vivo* (EHC 216, WHO, 2000).

Η οξεία δοσολογία της ουσίας σε ποντίκια προκαλεί απώλεια συντονισμού (αταξία) (WHO, 2000). Χρόνιες έρευνες σε αρουραίους και ποντίκια δεν επέδειξαν στοιχεία μεταβολών στη συμπεριφορά τους ούτε και ιστοπαθολογικές μεταβολές στους νευρικούς ιστούς τους (WHO, 2000). Ακόμη, οι δοκιμές για πιθανές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των ποντικών και αρουραίων δεν επέδειξε δομικές μεταβολές (WHO, 2000). Τα αποτελέσματα των δοκιμών στην αναπαραγωγική διαδικασία, το σπέρμα και τις ωοθήκες δεν αποτελούν ένδειξη τοξικότητας στο αναπαραγωγικό τους σύστημα (WHO, 2000). Η ουσία προκαλεί ηπατική νέκρωση στους αρουραίους σε ίσες ή μεγαλύτερες δοσολογίες των 120 mg/kg του σωματικού βάρους ημερησίως (EHC 216, WHO, 2000). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι προκαλεί ηπατικούς όγκους στα ποντίκια (EHC 216, WHO, 2000).

Δεν έχει αποσαφηνιστεί εάν συσχετίζεται με καρκινογόνο δράση η μητρική ουσία ή οι μεταβολίτες της. Οι δυο μεταβολίτες του υδρίτη της χλωράλης, το τριχλωροξικό οξύ και το διχλωροξικό οξύ, έχουν επηρεάσει τους ηπατικούς όγκους στα ποντίκια, δρώντας ως πρόδρομες ενώσεις του όγκου (EHC 216, WHO, 2000). Ο CH μεταβολίζεται ταχέως στους αρουραίους και τα ποντίκια, παράγοντας τους κύριους μεταβολίτες, τριχλωροαιθανόλη και τριχλωροξικό οξύ (στα ποντίκια παρουσιάζεται μια υψηλή συγκέντρωση σε τριχλωροξικό οξύ από ότι στους αρουραίους). Η συγκέντρωση στο πλάσμα για τον CH ήταν εξαρτημένη από τη δοσολογία. Ωστόσο, οι οδοί μεταβολισμού δεν επηρεάστηκαν από τη δοσολογία ή από το φύλο (WHO, 2005).

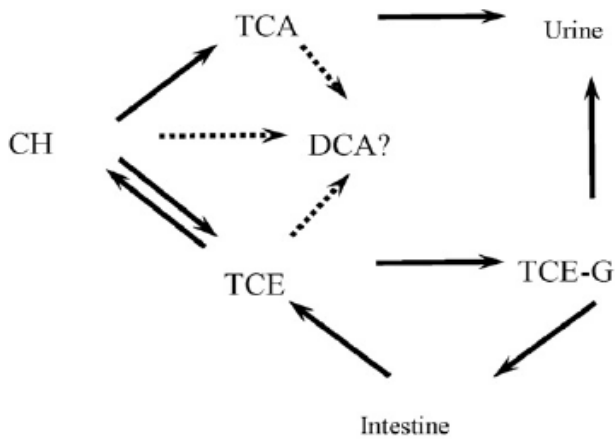
Εντούτοις, δεν παρατηρήθηκαν επιδημιολογικά ευρήματα για καρκινογένεση σε ανθρώπους που να συσχετίζουν την ανάπτυξη καρκίνου με την έκθεση στον υδρίτη της χλωράλης, παρότι η ουσία χρησιμοποιείται για αρκετές δεκαετίες ως ηρεμιστικό και υπνωτικό φάρμακο σε ενήλικες και παιδιά. Λόγω ανεπαρκών τεκμηρίων σε ανθρώπους και περιορισμένων ενδείξεων σε πειραματόζωα, ο IARC δεν έχει κατατάξει την εν λόγω ουσία στις ουσίες που προκαλούν καρκινογένεση στους ανθρώπους.

1.3.8 ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

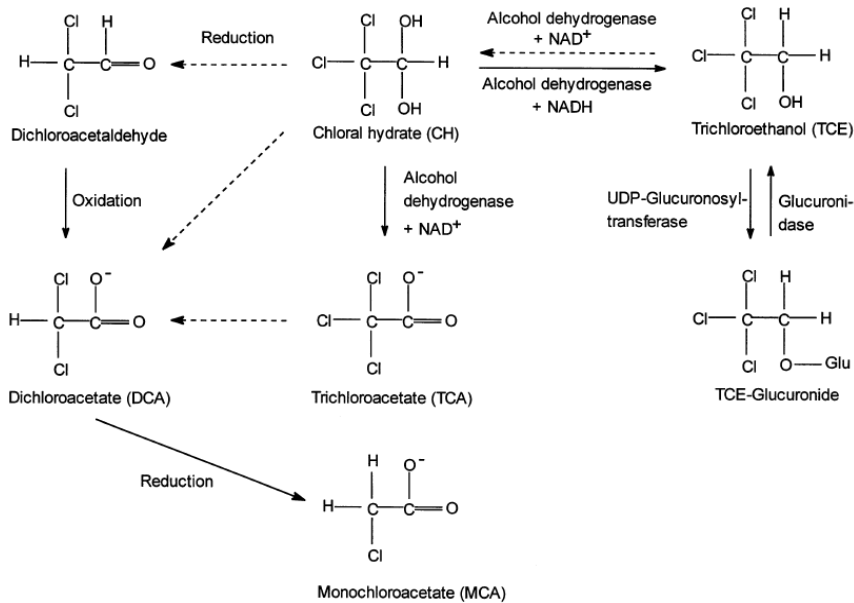
Η φαρμακολογική και τοξικολογική του δράση συσχετίζεται άμεσα με τον μεταβολίτη του, την 2,2,2-τριχλωροαιθανόλη (WHO, 2000). Με βάση φαρμακοκινητικά στοιχεία, ο υδρίτης της χλωράλης και ο φαρμακολογικά ενεργός μεταβολίτης τριχλωροαιθανόλη δεν αφομοιώνονται από το ανθρώπινο σώμα (Gilman *et al.*, 1985, όπως αναφέρεται στο WHO, 2005).

Στους ανθρώπους ο CH απορροφάται ταχεία και στη συνέχεια είτε οξειδώνεται προς τριχλωροξικό οξύ (8%), είτε ανάγεται σε τριχλωροαιθανόλη (92%), στο συκώτι, κυρίως, αλλά και στο νεφρό. Αποτελεί προϊόν μεταβολισμού του τριχλωροαιθενίου και τετραχλωροαιθενίου (βιομηχανικοί διαλύτες) και συντίθεται στο συκώτι από το κυτόχρωμα P450 2E1 (Bronley-DeLancey *et al.*, 2006). Οι προαναφερόμενοι διαλύτες θεωρούνται ουσίες ύποπτες για καρκινογόνο δράση. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια ανάγουν τον CH προς τριχλωροαιθανόλη από το ένζυμο αλκοολική δεϋδρογονάση, κατά την παρουσία του NADH. Οξειδώνεται σε τριχλωροξικό οξύ από το ίδιο ένζυμο κατά την παρουσία του NAD⁺ (Henderson *et al.*, 1997; WHO, 2005; Bronley-DeLancey *et al.*, 2006). Μια έρευνα παρουσίασε την πρώτη ένδειξη του *in vivo* βιομετασχηματισμού του CH σε διχλωροξικό οξύ στους ανθρώπους (Henderson *et al.*, 1997).

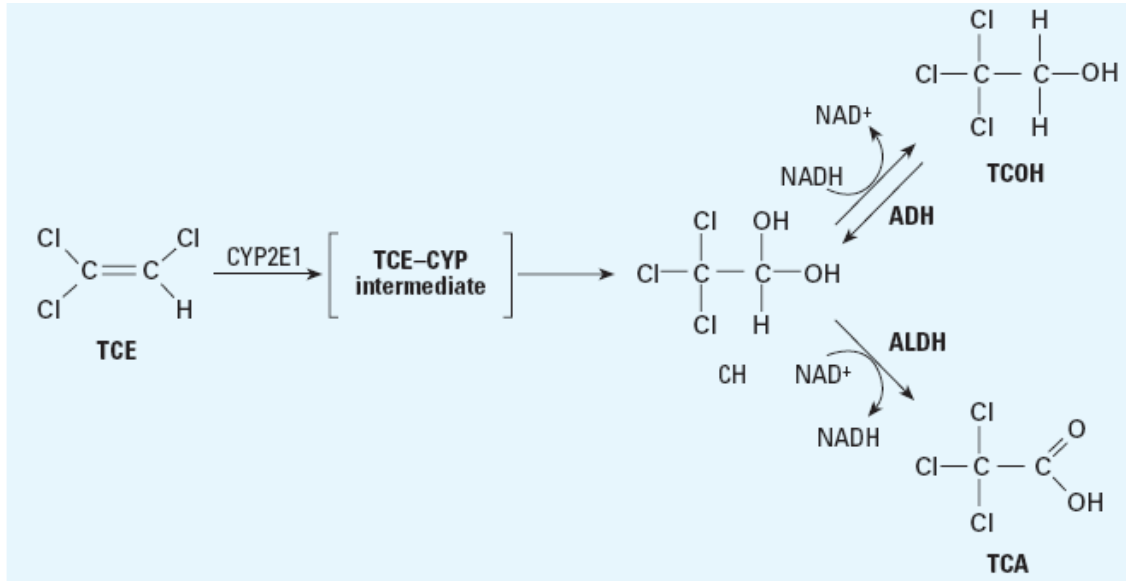
Ο CH απορροφάται ολόκληρος και μεταβολίζεται ταχεία μετά την κατάποση. Οι κύριοι μεταβολίτες είναι ο γλυκουρονίτης του, η τριχλωροαιθανόλη, το τριχλωροξικό οξύ και ενδεχομένως να σχηματίζονται μικρές ποσότητες διχλωροξικού οξέος (EHC 216, WHO, 2000). Ο χρόνος ημίσειας ζωής της τριχλωροαιθανόλης και του γλυκουρονίτη του στους ανθρώπους είναι περίπου 8 ώρες, και της τριχλωροαιθανόλης 4 ώρες. Η κύρια πορεία της έκκρισης των μεταβολιτών του CH ελαχιστοποιείται στα ούρα. Οι συγκεντρώσεις της ένωσης και των μεταβολιτών της που βρέθηκαν στο μητρικό γάλα γυναικών που ακολούθησαν φαρμακευτική αγωγή με την εν λόγω ουσία, ήταν σχετικά χαμηλές για να έχουν επίπτωση και στα βρέφη που βρίσκονται σε περίοδο γαλουχίας (WHO, 2000).



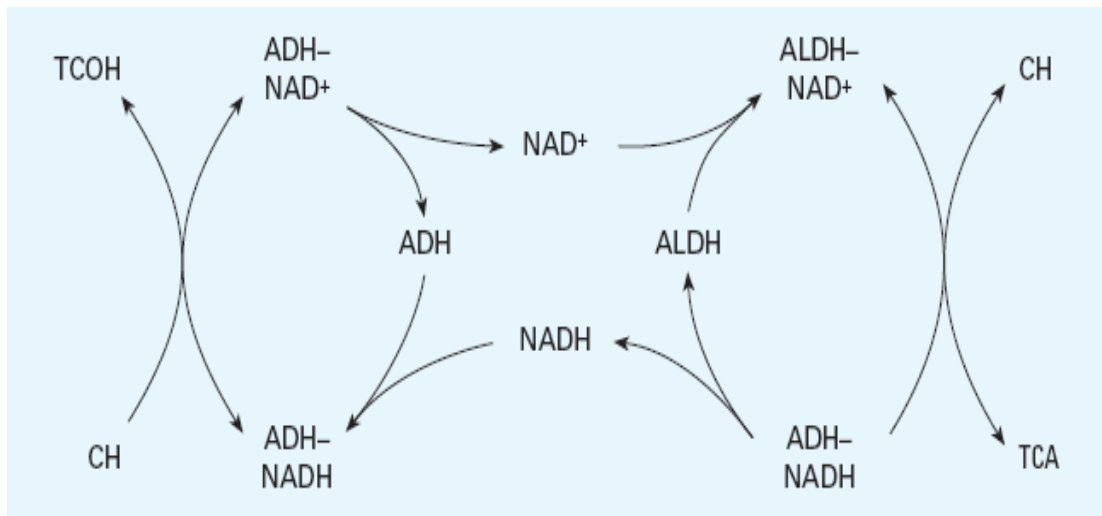
Σχήμα 1: Γενικό περίγραμμα του μεταβολισμού του υδρίτη της χλωράλης και ο εντεροηπατικός κύκλος του γλυκουρονίτη της τριχλωροαιθανόλης (TCE-G). Η μετατροπή του CH σε τριχλωροαιθανόλη είναι αντιστρεπτή, ενώ η μετατροπή του σε τριχλωροξικό οξύ είναι, ουσιαστικά, μη αντιστρεπτή (Merdink *et al.*, 2008)



Σχήμα 2: Προτεινόμενες οδοί βιομετασχηματισμού του υδρίτη της χλωράλης στους ανθρώπους. Τα συμπαγή βέλη δείχνουν επαληθευμένες οδούς αντίθετα προς τα διακεκομμένα που οδηγούν σε υποθετικές οδούς (Yan *et al.*, 2006)



Σχήμα 3: Μεταβολισμός του τριχλωροαιθυλενίου και επακόλουθη μετάβαση σε δυο οδούς, την οδό που οδηγεί στη σύνθεση καρκινογόνου και εκείνη που σχηματίζεται το μη καρκινογόνο της, τριχλωροξικό οξύ και τριχλωροαιθανόλη, αντίστοιχα (Bronley-DeLancey *et al.*, 2006)



Σχήμα 4: Προτεινόμενη πορεία οξείδωσης και αναγωγής του υδρίτη της χλωράλης από τα δυο ένζυμα, την αλκοολική και την αλδεϋδική δεϋδρογονάση (Bronley-DeLancey *et al.*, 2006)

1.3.9 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

1.3.9.1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Ο CH ενδέχεται να απελευθερωθεί στο περιβάλλον μέσω των ακόλουθων οδών:

- Διεργασίες επεξεργασίας των αποβλήτων που συνοδεύονται με χλωρίωση
- Παρασκευή, χημικώς, καθαρού φαρμακευτικού σκευάσματος υδρίτη της χλωράλης
- Ροή των αποβλήτων κατά τη διάρκεια παρασκευής εντομοκτόνων και ζιζανιοκτόνων που χρησιμοποιούν την ουσία ως ενδιάμεσο (US EPA, 2000, αναφέρεται στο WHO, 2005).

Ο υδρίτης της χλωράλης δεν υπάρχει ως φυσικό προϊόν. Η κυριότερη πηγή προέλευσής του για τους ανθρώπους είναι το πόσιμο νερό. Η ένωση και οι μεταβολίτες του, τριχλωροξικό και διχλωροξικό οξύ, αποτελούν τα παραπροϊόντα που σχηματίζονται κατά την απολύμανση με χλώριο. Ο άνθρακας προέρχεται από τη φυσική οργανική ύλη (χουμικές και φουλβικές ενώσεις) που περιέχει η πηγή του νερού. Η σχηματιζόμενη ποσότητα του CH εξαρτάται από τη συγκέντρωση χουμικών και φουλβικών ενώσεων καθώς και από τις συνθήκες χλωρίωσης. Πρόσθετη ποσότητα του CH μπορεί να σχηματιστεί εάν νερό που περιέχει χουμικές και φουλβικές ενώσεις αναμιχθεί με τρόφιμα που τις περιέχουν (Wu *et al.*, 1998; WHO, 2000). Οι άνθρωποι που εκτίθενται απευθείας στις ενώσεις τριχλωροαιθυλένιο και τετραχλωροαιθυλένιο, εκτίθενται και στον CH καθώς οι πρώτες μεταβολίζονται στην εν λόγω ουσία (WHO, 2000) (Σχήμα 3).

Ο CH έχει ανιχνευτεί στο πόσιμο νερό σε συγκεντρώσεις έως και 100 µg/L, αλλά οι συνήθεις συγκεντρώσεις δεν υπερβαίνουν τα 10 µg/L. Οι συγκεντρώσεις είναι γενικά πιο υψηλές στην επιφάνεια από ότι στα υπόγεια νερά και εμφανίζουν αυξήσεις κατά τη διάρκεια της διασποράς. Στις Η.Π.Α, η τυπική συγκέντρωση της ουσίας στα αποταμιεύματα του δημόσιου νερού είναι 5 µg/L (WHO, 2000). Το 1993 οι οδηγίες για την ποιότητα του πόσιμου νερού όρισαν για τον CH μια προληπτική υγειονομική τιμή 10 µg/L. Τα περισσότερα στοιχεία συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες θεωρείται απίθανο να εκτεθούν οι οργανισμοί στην ουσία σε υψηλές συγκεντρώσεις (WHO, 2000).

Τα επίπεδα του CH στο πόσιμο νερό μπορούν να ελαττωθούν με μεταβολές στις πρακτικές απολύμανσης. Ενδεικτικά αναφέρονται ορισμένες από τις βελτιωμένες πρακτικές:

- Αναβαθμισμένη κροκίδωση για την απομάκρυνση των οργανικών πρόδρομων ενώσεων

- Μετατόπιση του σημείου απολύμανσης για να αποτραπεί η αντίδραση ανάμεσα στα άτομα χλωρίου και τις πρόδρομες ενώσεις
- Χρήση των χλωραμινών για την υπολειμματική απολύμανση αντί των ιόντων χλωρίου
- GAC επεξεργασία (WHO, 2006).

1.3.9.2 ΜΕΤΑΦΟΡΑ, ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Για την εκτίμηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων είναι διαθέσιμος περιορισμένος αριθμός στοιχείων. Τα μεθανοτροφικά βακτήρια μπορούν να μετατρέψουν τον CH σε τριχλωροαιθανόλη και τριχλωροξικό οξύ. Υπό ορισμένες προϋποθέσεις η ουσία υφίσταται αβιοτική αποδόμηση. Ωστόσο, διατίθεται ελλιπής αριθμός στοιχείων σχετικά με την παρεμπόδιση της ανάπτυξης βακτηρίων, αλγών και πρωτόζωων. Τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την εκτίμηση της επικινδυνότητας της ουσίας στο περιβάλλον είναι ασαφή (WHO, 2000).

1.3.9.3 ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ

Η έρευνα εστιάστηκε στη φαρμακοδυναμική του CH σε νεογνά γεννημένα πρόωρα και απέδωσε σημαντικά ευρήματα (Allegaert *et al.*, 2005). Η ουσία χορηγήθηκε ως αναισθητικό και παρακολούθηθηκε ο βαθμός νάρκωσης, η διατροφική συμπεριφορά και τα καρδιοαναπνευστικά επεισόδια (βραδυκαρδιακά και ασφυξία) (Allegaert *et al.*, 2005). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση στη νάρκωση έως και 12 ώρες μετά την πρόσληψη και αύξηση του αριθμού των βραδυκαρδιακών επεισοδίων. Η δια στόματος πρόσληψη χαμηλών δόσεων του CH στα πρόωρα νεογνά συνδέθηκε με συγκεκριμένες παρενέργειες, που πιθανώς να ανακλούν την ειδική φαρμακοκινητικότητα της ουσίας στα νεογνά (Allegaert *et al.*, 2005). Εντούτοις, τα βραδυκαρδιακά περιστατικά και η αλληλεπίδραση μεταξύ φαρμακοκινητικότητας και δυναμικής αυτού του φαρμάκου στο εν λόγω μέρος του πληθυσμού χρήζει περαιτέρω έρευνας (Allegaert *et al.*, 2005).

1.3.10 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ

Η EPA έχει αποφασίσει να μην καθορίσει έναν στόχο για το μέγιστο επίπεδο ρύπανσης (MCLG) στο στάδιο του DBPR. Η απόφαση στηρίχθηκε στο γεγονός ότι ο CH θα

ελέγχεται βάσει των MCL για τα ΤΗΜ και ΗΑAs. Το τελικό στάδιο 1 του DBPR περιέχει τα MCLGs για τέσσερα ΤΗΜs (χλωροφόρμιο, βρωμοδιχλωρομεθάνιο, διβρωμοχλωρομεθάνιο, βρωμοφόρμιο), δυο αλογονοξέα (διχλωροξικό και τριχλωροξικό οξύ), βρωμικά και χλωριώδη [EPA, 1998 (πίνακας ΙΙ-2 σχετικά με τα επίπεδα συγκεντρώσεων MCLG)].

Πίνακας 3 : Αξιολόγηση επικινδυνότητας για τον CH.

	Ένδειξη		Αναφορά
Κατευθυντήρια γραμμή Βασισμένη σε 90-ημερών μελέτη σε ποντίκια όπου παρουσιάστηκε τοξικότητα στο συκώτι (Koufjounou et al., 2008).	10μg/L	Αποτελεί μεταβλητή τιμή	Richardson <i>et al.</i> , 2007
Επίπεδο τοξικότητας στο αίμα	10mg/100ml		WHO, 2005
Επίπεδο θανατηφόρας δόσης στο αίμα	25mg/100ml		WHO, 2005
MCLG (Σχετικά με την τοξικότητα στο συκώτι αξιολογήθηκαν τα ευρήματα μιας έρευνας 90 ημερών σε ποντίκια)	0,04 mg/L (40 ppb)		Sanders <i>et al.</i> 1982; EPA

1.3.11 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

1.3.11.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Η ανάλυση του CH πραγματοποιείται στα πλαίσια προσδιορισμού των πτητικών οργανικών παραπροϊόντων χλωρίωσης (ΕΥΔΑΠ, 2005). Έχουν αναπτυχθεί τέσσερις μέθοδοι για τον προσδιορισμό της ουσίας και ειδικότερα είναι οι ακόλουθες:

- Υγρή Υγρή Εκχύλιση – Αέρια Χρωματογραφία- Ανιχνευτής Σύλληψης Ηλεκτρονίων (LLE-GC-ECD)
- Υγρή Υγρή Εκχύλιση - Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (LLE-GC-MS)
- Purge and Trap – Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (P&T – GC - MS)
- Headspace - Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (HS-GC-MS)

Η συνδυασμένη τεχνική ανάλυσης με GC-MS αποτελεί την πιο εκλεκτική και ευαίσθητη μέθοδο (Yan *et al.*, 1999). Πρότερες αναλυτικές μέθοδοι με τη συνδυασμένη τεχνική GC-MS χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση της δομής των μεταβολιτών του CH και για τον ποσοτικό προσδιορισμό της τριχλωροαιθανόλης (Yan *et al.*, 1999). Ο CH όπως

και οι μεταβολίτες του, είναι δυνατό, να προσδιοριστούν στα βιολογικά δείγματα, αφού πρώτα μετατραπούν σε μεθυλεστέρες. Ακολούθως, διαχωρίζονται και ανιχνεύονται με τη μέθοδο της GC-MS (Yan *et al.*, 1999, αναφέρει WHO, 2000). Το εύρος της μέτρησης βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές 0,12 και 7,83 $\mu\text{mole/L}$ (είναι ισοδύναμο με 20-1290 $\mu\text{g/L}$) (WHO, 2000). Αναπτύχθηκε μια μέθοδος με την τεχνική GC-MS για τη μελέτη της κινητικότητας και του μεταβολισμού στους ανθρώπους (Yan *et al.*, 1999). Η τεχνική καθιστά εφικτή την ταυτόχρονη ταυτοποίηση όλων των γνωστών μεταβολιτών του CH σε ένα μικρό δείγμα πλάσματος του αίματος (Yan *et al.*, 1999).

Ο CH που προέρχεται από δείγματα επεξεργασμένου νερού ανιχνεύεται με δυο συνδυασμένες τεχνικές, την αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή δέσμησης ηλεκτρονίων, GC-ECD και τη GC-MS. (Chemical aspects 8, Guidelines for drinking-water quality). Η διαδικασία εκχύλισης της ουσίας με έναν διαλύτη (Μέθοδος EPA 551,1) αναπτύχθηκε από τον EPA για την ανάλυση του CH προσθέτοντας τον MTBE ως διαλύτη, με όριο ανίχνευσης τα 0,5 $\mu\text{g/L}$. Η ουσία αναλύθηκε χρησιμοποιώντας GC-ECD (WHO, 2005). Το όριο ανίχνευσης είναι κατά προσέγγιση 30 ng/L (WHO, 2005). Βάσει του πρωτοκόλλου της μεθόδου EPA 551, προτάθηκαν βελτιώσεις που περιλαμβάνουν ρύθμιση του pH στα 4,5 και προσθήκη ασκορβικού οξέος για να δεσμεύσει το υπολειμματικό χλώριο. Τα εκχυλίσματα του νερού αναλύθηκαν με GC-ECD (WHO, 2005). Το ελάχιστο όριο αποτίμησης για τον CH με την εν λόγω μέθοδο είναι 0,1 $\mu\text{g/L}$ (WHO, 2005).

Επιπλέον, για τον προσδιορισμό της ουσίας χρησιμοποιείται η μέθοδος 5710D της 20ης έκδοσης των Πρότυπων Μεθόδων για την εξέταση του νερού και των υγρών αποβλήτων (WHO, 2005). Η μέθοδος προϋποθέτει ότι ο CH μπορεί να αναλυθεί μαζί με τα THMs αν προστεθούν ως αναγωγικά αντιδραστήρια θειώδεις ενώσεις που παρεμποδίζουν την αντίδραση (WHO, 2005). Η ουσία αναλύεται ακόμη και με υγρή – υγρή εκχύλιση σε συνδυασμό με τριχοειδή στήλη GC-ECD, με όριο ανίχνευσης τα 0,5 $\mu\text{g/L}$ (APHA *et al.*, 1998, αναφέρει WHO, 2005).

Μια μέθοδος για τον προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων του CH σε περιβαλλοντικά δείγματα είναι η HPLC με ανίχνευση υπέρυθρη απορρόφηση. Το χαμηλότερο ποσοτικό όριο για μια ποικιλία καρβονυλίων διευρύνεται από 1 έως 6 ng (Fung & Grosjean, 1981; WHO, 2000). Η HPLC δεν προτείνεται γιατί αφενός ο CH και οι μεταβολίτες του υπολείπονται σε απορρόφηση στην περιοχή υπέρυθρης ακτινοβολίας και αφετέρου τα ραδιοϊσότοπα είναι μη πρακτικά στην έρευνα για τον ανθρώπινο οργανισμό (WHO, 2000).

Μια φασματο-φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του CH σε εμπορικά φαρμακευτικά σκευάσματα βασίζεται στην αντίδραση μεταξύ της quinaldine ethyl iodide και

του CH. Παραγόμενο προϊόν είναι η σταθερού μπλε χρώματος κυανίνη (συνθετική βαφή) με μέγιστη απορρόφηση στα 605 nm περίπου (Helrich, 1990; WHO, 2000).

Ο CH και οι μεταβολίτες του (τριχλωροαιθανόλη, γλυκουρονίτης της τριχλωροαιθανόλης και τριχλωροξικό οξύ) μπορούν να προσδιοριστούν στο ομογενοποιημένο σκώτι των αουραίων, χρησιμοποιώντας τη GC με απομόνωση των πτητικών ενώσεων από το μη πτητικό μητρικό δείγμα (μέθοδος υπερκείμενης φάσης) και ανιχνευτή δέσμησης ηλεκτρονίων (Kopper & Dalgaard, 1988; WHO, 2000). Τα όρια ανίχνευσης για την τριχλωροαιθανόλη και το γλυκουρονίτη της είναι 0,06 µg/ml και για τον CH και το τριχλωροξικό οξύ είναι 0,02 µg/ml. Υπάρχει ακόμη μια συγκρίσιμη μέθοδος (Breimer *et al.*, 1974; αναφέρει WHO, 2000) για τον προσδιορισμό των χημικών ενώσεων στο αίμα και τα ούρα με όρια ανίχνευσης 0,5 µg/ml για τον CH (WHO, 2000).

1.3.11.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Η φαρμακολογική δραστηριότητα του CH προσδιορίζεται από τον μεταβολίτη του τριχλωροαιθανόλη που μεταβολίζεται προς τριχλωροξικό οξύ. Η τελευταία ένωση ανιχνεύεται ποιοτικά με το τεστ Fujiwara. Το προς εξέταση βιολογικό δείγμα είναι τα ούρα και το τεστ ολοκληρώνεται σε σκοτεινό χώρο. Η δοκιμή είναι πολύ ευαίσθητη και ανιχνεύει μια θεραπευτική δοσολογία της ουσίας 12-24 ώρες μετά την κατάποση. Η εμφάνιση έντονου κόκκινο-λιλά χρώματος στην υπερκείμενη στιβάδα της πυριδίνης αποδεικνύει την παρουσία ενώσεων που έχουν στο μόριό τους τρία άτομα χλωρίου δεσμευμένα με το ίδιο άτομο άνθρακα (IPCS).

1.4 1,3-ΔΙΧΛΩΡΟ-2-ΠΡΟΠΑΝΟΛΗ

1.4.1 ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ

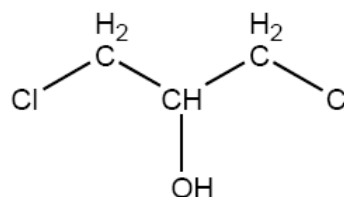
Cas Registry No.: 96-23-1

EINECS: 202-491-9

Μοριακός τύπος: C₃H₆Cl₂O

Σχετική Μοριακή Μάζα: 128,98 g/mole

Συντακτικός τύπος:



1.4.2 ΓΕΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Η χημική ένωση 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη, 1,3-DCP, είναι μια χλωριωμένη ένωση διότι περιέχει άτομα χλωρίου στο μόριό της. Ανήκει στην οικογένεια των αλογονωμένων ενώσεων που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή βιομηχανικών προϊόντων όπως είναι οι σκληρυνόμενες ρητίνες, τα φιλμ κυτταρίνης και τα επιχρίσματα. Θεωρείται παραπροϊόν της χλωρίωσης στο πόσιμο νερό. Εντάσσεται στην ευρύτερη κατηγορία των αλογονωμένων αλκοολών, τις επονομαζόμενες αλοϋδρίνες. Γενικά, η 1,3-DCP καλείται διχλωροϋδρίνη και διχλωροπροπανόλη. Ειδικότερα, η ένωση ανήκει στην κατηγορία χλωροϋδρίνες της γλυκερόλης στην οποία οι δυο ακραίες υδροξυλομάδες (-OH) έχουν αντικατασταθεί από δυο άτομα χλωρίου (NTP, 2005). Πρόκειται για μια υγρή, ημιπτητική οργανική ένωση με χαρακτηριστική αιθερική οσμή. Σχηματίζεται κατά την αντίδραση ατόμων χλωρίου με τα λιπίδια των τροφίμων όταν επικρατούν ορισμένες συνθήκες, όπως για παράδειγμα κατά την προετοιμασία του φαγητού και κατά την αποθήκευση (WHO, 2006). Αποτελεί μια πρόσμιξη του φυτοφαρμάκου 1,3-διχλωροπροπενίου και ίχνη της μπορεί να βρεθούν στις υδρολυμένες φυτικές πρωτεΐνες (L'Huillier *et al.*, 2002).

Η εστίαση των ερευνών στην 1,3-DCP δικαιολογείται από την ανησυχία για καρκινογόνα, μεταλλαξιογόνα και γονιδιοτοξική δράση λόγω της απόθεσης στο περιβάλλον και βιοσυσσωρευσης στους τελικούς αποδέκτες, τους έμβιους οργανισμούς και τον άνθρωπο. Η τοξικότητα και η παραμονή των αλογονανθράκων στο βιολογικό περιβάλλον αποδίδεται στη σταθερότητα του δεσμού άνθρακα – χλωρίου, C-Cl (Nikolaki *et al.*, 2007).

1.4.3 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Πίνακας 4: Φυσικοχημικές ιδιότητες της 1,3-DCP

ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΤΙΜΗ	ΑΝΑΦΟΡΑ
Σημείο τήξεως	-4 °C	MUT/01/06
Σημείο ζέσεως	172-176 °C, 760 mm Hg	WHO 2007
Σημείο ανάφλεξης	85 °C	NTP, 2005
Πυκνότητα	1,351 g/ml στους 25 °C	NTP, 2005
Πίεση εξάτμισης	0,75 mm Hg (25 °C)	MUT/01/06
Δείκτης διάθλασης	1,482-1,484	
Διαλυτότητα στο νερό	99 gr/L στους 25 °C ή 15,2 g/100g στους 20 °C	WHO 2007
Αναμιγνύεται	Οργανικούς διαλύτες (αιθανόλη, διαιθυλαιθέρα), φυτικές πρωτεΐνες	NTP, 2005 MUT/01/06
Συντελεστής κατανομής σε μίγμα οκτανόλης/νερού	54,6 σε pH 1-10	NTP, 2005
LogK _{ow}	0,663 ± 0,5	NTP, 2005
pK _a	12,87 ± 0,20	NTP, 2005

1.4.4 ΟΔΗΓΙΕΣ ΜΕ ΑΝΑΦΟΡΕΣ ΣΤΗΝ 1,3-DCP

Οδηγία 91/155/EEC: Όλα τα σκευάσματα που περιέχουν διχλωροπροπανόλες (μεταξύ των άλλων και η 1,3-DCP) σε ποσότητες περισσότερες από 0,1% θα πρέπει να αναφέρονται στην ετικέτα ως τοξικά και καρκινογόνα, σύμφωνα με την οδηγία (Nikolaki, 2007).

Οδηγία 76/769/EOK: Σημείο 29 – Καρκινογόνες ουσίες: κατηγορία 2, Αριθμός καταλόγου: 602-064-00-0, Κατηγορία M21 (Οδηγία 97/56/EK του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 20^{ης} Οκτωβρίου 1997).

Ευρωπαϊκή οδηγία 76/464/EWG, άρθρο 7, οδηγία πλαίσιο 2000/60/EG: Πρόσφατα, η ουσία έχει ερευνηθεί σε ένα πιλοτικό πρόγραμμα μέτρησης αναφορικά με την υποβάθμιση του φυσικού νερού από επικίνδυνες ουσίες (Schuhmacher *et al.*, 2005).

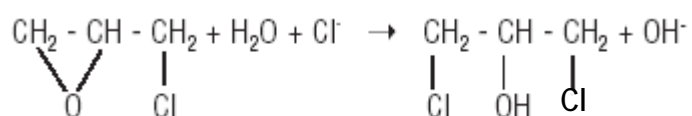
1.4.5 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ

Δυο από τις χλωριωμένες προπανόλες που υπάρχουν ως ρυπαντές στις υδρολυμένες φυτικές πρωτεΐνες είναι η 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη και η 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη (WHO, 2002). Ο σχηματισμός τους οφείλεται σε διεργασίες αποβουτύρωσης/απολίπανσης

φυτικών πρωτεϊνών με τη συνήθη υδρόλυση κατά την αντίδρασή τους με υδροχλωρικό οξύ, HCl (WHO, 2002).

➤ Σχηματισμός από επιχλωρυδρίνη

Η επιχλωρυδρίνη είναι το μονομερές που χρησιμοποιείται στην παραγωγή των εποξυ-ρητινών. Πολλές είναι οι τεχνικές που κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί με στόχο να απομακρύνουν την επιχλωρυδρίνη από τα συστήματα καθαρισμού αερίων. Γενικά, η επιχλωρυδρίνη σχηματίζεται σε διάφορα στάδια διεργασιών σε βιομηχανική και ερευνητική κλίμακα. Πιο συγκεκριμένα, πιθανή είναι η παρουσία της στη στήλη κατά την εκχύλιση αερίου-υγρού, κατά τον καθαρισμό του αέρα που εξέρχεται από συστήματα κενού, καθαρισμό αέριας φάσης μιας δεξαμενής (στη διάρκεια πλήρωσης), απολύμανση των δεξαμενών. Σε περιπτώσεις χρήσης του υγρού υδροχλωρικού οξέος, η επιχλωρυδρίνη αντιδρά, ταχέως, με τα ιόντα Cl⁻ και σχηματίζεται η 1,3-DCP. Ωστόσο, ο σχηματισμός της 1,3-DCP μπορεί να αποφευχθεί με ελεγχόμενη απολύμανση (Solvay Chemicals, 2003).



Αντίδραση: Σχηματισμός της 1,3-DCP από την επιχλωρυδρίνη παρουσία ιόντων χλωρίου (Solvay Chemicals, 2003).

➤ Σχηματισμός από το Fyrol FR-2

Η ένωση Fyrol FR-2 [εμπορική ονομασία της tri (1,3-dichloro-2-propyl phosphate)] που χρησιμοποιείται ως επιβραδυντής φλόγας σε ενδύματα μεταβολίζεται προς διχλωροπροπανόλες μεταξύ των οποίων και σε 1,3-DCP (L'Huillier *et al.*, 2002; Nomeir *et al.*, 1981) από τα μικροσωματικά ένζυμα (Nomeir *et al.*, 1981).

1.4.6 ΧΡΗΣΕΙΣ

Χρησιμοποιείται σε υψηλούς όγκους ως ενδιάμεσο στην παραγωγή επιχλωρυδρίνης και 1,2,3-τριχλωροπροπάνιο (NTP, 2005). Πρόσφατα, εξετάστηκε μια μέθοδος βιομηχανικής παραγωγής της επιχλωρυδρίνης λόγω υψηλού οικονομικού κόστους αφενός του πετρελαίου και αφετέρου των προϊόντων του (Ma *et al.*, 2007). Η νέα μέθοδος στηρίζεται στην αφυδρογονοχλωρίωση των ισομερών διχλωροπροπανολών, 1,3-DCP και 2,3-DCP (Ma *et al.*,

2007). Χρησιμοποιείται σε βιομηχανική κλίμακα και πιο συγκεκριμένα στην παραγωγή σκληρής ρητίνης, στη χλωρίωση του νερού ή στην εργοστασιακή μεταποίηση του χαρτιού (Nikolaki *et al.*, 2007).

1.4.7 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Τα συμπτώματα τοξικότητας της 1,3-DCP στον άνθρωπο περιλαμβάνουν ερεθισμό των βλενογόνων μεμβρανών, των ματιών και του δέρματος, ναυτία και έμετο (L'Huillier *et al.*, 2002). Η 1,3-DCP αναφέρθηκε ως καρκινογόνος ουσία στους αρουραίους και επιβεβαιώθηκε *in vitro* (L'Huillier *et al.*, 2002). Δεν αναφέρθηκε τερατογένεση σε ανθρώπους ή πειραματόζωα (L'Huillier *et al.*, 2002). Ωστόσο, προκαταρκτικές έρευνες έχουν αποδώσει στην ουσία εμβρυοτοξικότητα σε υγιή έμβρυα νεοσσών που εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις άνω του 1μM με την τεχνική της μικροένεσης (L'Huillier *et al.*, 2002).

Η 1,3-DCP έχει αποδειχθεί μεταλλαξιογόνα των κυττάρων σε *in vitro* πειράματα και προκαλεί όγκους σε αρουραίους. Παρά τον περιορισμένο αριθμό των ερευνών τοξικότητας, η επιτροπή του κώδικα τροφίμων (Codex Alimentarius Commission) χαρακτήρισε την ουσία γονιδιοτοξική και καρκινογόνο (Schuhmacher *et al.*, 2005). Η επιτροπή κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η κύρια επίπτωσή της 1,3-DCP είναι η καρκινογένεση (WHO, 2006 JECFA/67/SC). Γενικά, η ένωση είναι μετρίως τοξική μέσω της αναπνευστικής οδού, της κατάποσης και σε επαφή με το δέρμα (NTP, 2005). Η ουσία αποδείχθηκε αρνητική σε γονιδιοτοξικότητα στις δυο νέες *in vivo* έρευνες. Οι περιορισμοί στις έρευνες, τα θετικά ευρήματα στις δοκιμές για τη γονιδιοτοξικότητα *in vitro* και η ανεπάρκεια γνώσης σχετικά με τους μηχανισμούς εμφάνισης όγκων σε ποικίλες θέσεις, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι δεν μπορεί να αποκλειστεί ένας γονιδιοτοξικός μηχανισμός δράσης (WHO, 2006; WHO, 2006 JECFA/67/SC). Με γνώμονα τα όρια έκθεσης (WHO, 2006 JECFA/67/SC), η επιτροπή αποφάνθηκε ότι δε συντρέχει λόγος ανησυχίας σχετικά με τις εκτιμημένες προσλήψεις της ουσίας στην ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο συμπέρανε ότι η μέση, αντιπροσωπευτική, ημερήσια πρόσληψη της 1,3-DCP για το γενικό πληθυσμό είναι 0,051 μg/kg σωματικού βάρους (WHO, 2006; WHO, 2006 JECFA/67/SC).

Εξετάστηκαν δυο νέες έρευνες (WHO, 2006 Technical Report Series No. 940) σχετικά με τη γονιδιοτοξικότητα, μια *in vivo* δοκιμή για τον πιθανό σχηματισμό μικροπυρήνων στο μυελό των οστών των αρουραίων και μια έκθεση για την απρογραμμάτιστη σύνθεση του DNA στα ηπατοκύτταρα των αρουραίων σε *in vivo/in vitro* πειράματα. Η 1,3-DCP αποδείχθηκε αρνητική στα ευρήματα των προς εξέταση ιστών. Εν

τούτοις, δεν επαληθεύθηκε η τοξικότητα στους ιστούς και για αυτό είναι ασαφές το επίπεδο έκθεσης στην εν λόγω ουσία. Σύμφωνα με τις συστάσεις της επιτροπής στην 61^η σύσκεψή της, γίνεται προσπάθεια να υπολογιστεί το όριο της έκθεσης βάσει των αποτελεσμάτων μακροπρόθεσμης έρευνας στους αρουραίους (WHO, 2006 Technical Report Series No. 940). Τα αποτελέσματα μιας ακόμη έρευνας σε αρουραίους (εγκομονούσες μητέρες και εμβρυικά αναπτύγματα), σε διάστημα 14 ημερών με λήψη από το στόμα συνεχών δοσολογιών, έδειξαν ότι η ουσία ήταν ελάχιστα εμβρυοτοξική αλλά όχι τερατογόνα (Lee *et al.*, 2009).

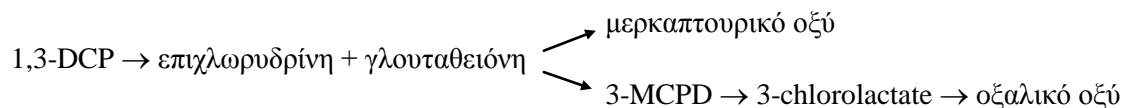
Με βάση τα αρνητικά αποτελέσματα της γονιδιοτοξικότητας *in vivo*, η επιτροπή επανεξέτασε τα αποτελέσματα από τη μακροπρόθεσμη έρευνα σχετικά με την καρκινογένεση που είχε πρωτύτερα αξιολογηθεί στην 57^η σύσκεψη (WHO, 2006 Technical Report Series No. 940). Σε μια έρευνα διάρκειας δυο ετών, δόθηκε στους αρουραίους πόσιμο νερό παρουσία της 1,3-DCP σε δοσολογία των 0, 2,1, 6,3 ή 19 mg/kg σωματικού βάρους, ημερησίως, στα 80 αρσενικά και 0, 3,4, 9,6 ή 30 mg/kg σωματικού βάρους, ημερησίως, στα 80 θηλυκά για 104 εβδομάδες (MUT/01/06). Αποδείχτηκαν αυξημένα περιστατικά όγκων και στα δυο φύλα στις υψηλότερες εξεταζόμενες δοσολογίες (MUT/01/06). Αντίθετα, κανένα περιστατικό όγκου δεν παρατήθηκε στις χαμηλότερες δοσολογίες, 2,1 και 3,4 mg/kg σωματικού βάρους, για τους αρσενικούς και τους θηλυκούς αρουραίους, αντίστοιχα (MUT/01/06). Αυξήσεις στα περιστατικά όγκων που συνδέονται με τη χορήγηση δοσολογίας (αδενώματα και καρκινώματα) εμφανίστηκαν στο συκώτι, νεφρά (μόνο στα αρσενικά), τη γλώσσα και το θυροειδή αδένα (MUT/01/06). Η έρευνα έδειξε ότι η 1,3-DCP ήταν καρκινογόνα στους αρουραίους σε δοσολογίες 6 mg/kg/day (80 mg/L στο πόσιμο νερό) και μεγαλύτερες (MUT/01/06).

Παρόλα τα αρνητικά αποτελέσματα για την *in vivo* γονιδιοτοξικότητα στους ιστούς (για παράδειγμα στο μυελό των οστών και το συκώτι) δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο γονιδιοτοξικότητας για τα ευρήματα νεοπλασιών (WHO, 2006 Technical Report Series No. 940). Το δεδομένο είναι ότι απουσιάζουν πειστικά αρνητικά στοιχεία γονιδιοτοξικότητας στα όργανα-στόχους για καρκινογένεση και υπάρχουν ευρήματα ότι η 1,3-DCP προκάλεσε σημειακές μεταλλάξεις στις καλλιέργειες των βακτηριακών κυττάρων και κυττάρων των θηλαστικών προκαλώντας πολύ-οργανική καρκινογένεση και στα δυο φύλα (WHO, 2006 Technical Report Series No. 940). Η επιτροπή επιβεβαίωσε ότι η 1,3-DCP θα πρέπει να ενταχθεί στις γενοτοξικές και καρκινογόνες ουσίες (WHO, 2006 Technical Report Series No. 940).

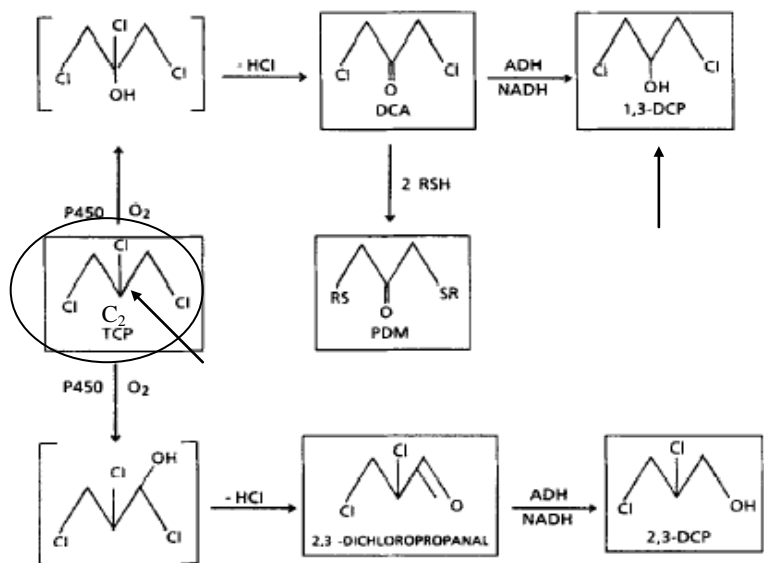
1.4.8 ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Γενικά υπάρχουν λίγα διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με την απορρόφηση, κατανομή και απέκκριση της 1,3-DCP (MUT/01/06). Σε μια έρευνα για την 1,3-DCP, σε δοσολογία 62 mg/kg bw με υποδόρια ένεση, σε αρσενικούς αρουραίους Wistar (Koga et al., 1992; MUT/01/06), ανιχνεύτηκε η ουσία, μέσω της απέκκρισης ούρων, με τη μορφή των μεταβολιτών (3-MCPD, 2-MCPD, 1,2-προπανοδιόλη). Οι Jones and Fakouri (1979) πρότειναν ότι η 1,3-DCP πιθανώς να μεταβολίζεται σε επιχλωρυδρίνη, που συνδέεται με τη γλουταθειόνη για να σχηματίσει μερκαπτονικό οξύ ή υδρολύεται σε 3-MCPD. Περαιτέρω μεταβολισμός της 3-MCPD θα μπορούσε να παράγει β-χλωρολακτικό (b-chlorolactate) (MUT/01/06) (Σχήμα 5).

Ένας μεταβολίτης της 1,3-DCP, η 1,3-διχλωροακετόνη, σχηματίζεται από τα κυτοχρώματα P450, 2E1 και 1A2 (L'Huillier et al., 2002). Αναγνωρίστηκε ότι ευθύνεται για νέκρωση στο συκώτι και διάφορες ακόμη δυσλειτουργίες (L'Huillier et al., 2002). Η οξείδωση του 1,2,3 – τριχλωροπροπανίου στον άνθρακα 2, οδηγεί στην ασταθή ένωση gem-χλωροϋδρίνη από την οποία αποβάλλεται σταδιακά υδροχλώριο, HCl, για να σχηματιστεί η 1,3-διχλωροακετόνη, DCA. Η 1,3-διχλωροακετόνη με την επίδραση της αλκοολικής δεϋδρογονάσης (ADH), ανάγεται προς την 1,3-DCP. Κατά την παρουσία της N-ακετυλοκυστεΐνης, RSH, η 1,3-διχλωροακετόνη υφίσταται σύζευξη και σχηματίζει την 1,3-(2-προπανόνη)-δι-S-(N-ακετυλοκυστεΐνη), PDM. Παρόμοια, η οξείδωση του 1,2,3 – τριχλωροπροπανίου στον άνθρακα 1, C₁, οδηγεί σε μια ασταθή gem – χλωροϋδρίνη η οποία με σταδιακή απώλεια υδροχλωρίου σχηματίζει την αλδεϋδη 2,3-διχλωροπροπανάλη. Με την επίδραση της αλκοολικής δεϋδρογονάσης, ADH, η αλδεϋδη ανάγεται προς 2,3-DCP (Weber et al., 1992) (Σχήμα 6).



Σχήμα 5: Μεταβολισμός της 1,3-DCP προς μερκαπτονικό οξύ ή υδρόλυση προς 3-MCPD



Σχήμα 6: Σχηματική απεικόνιση βιομετατροπής του 1,2,3 – τριχλωροπροπανίου σε μεταλλαξιόγόνους μεταβολίτες (Weber *et al.*, 1992)

1.4.9 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

1.4.9.1 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ

Εμφανίζεται στα φυσικά νερά ως παραπροϊόν από τη χρήση της χημικής ένωσης επιχλωροδρίνη, κατά την παραγωγή σκληρών ρητινών, χλωρίου για τη λεύκανση χαρτοπολτού ή ως παραπροϊόν των κροκιδωτικών από πολυαμίνη κατά την επεξεργασία του πόσιμου νερού. Επιπλέον, η ουσία έχει ταυτοποιηθεί σε δείγματα πόσιμου νερού μετά τη χλωρίωση (Schuhmacher *et al.*, 2005). Μέσω της ροής αποβλήτων είναι πιθανή η παρουσία της 1,3-DCP στο υδατικό περιβάλλον καθώς βρίσκει εφαρμογή ως διαλύτης, στην παραγωγή χρωμάτων, λάκας, εποξυ-ρητινών, φαρμακευτικών σκευασμάτων και ως επιβραδυντής φλόγας στα υφάσματα, (Schuhmacher *et al.*, 2005).

Μόλις πρόσφατα το Υπουργείο Γεωργίας και Δασοπονίας, Περιβάλλοντος και Διαχείρισης Υδάτινων Πόρων της Αυστρίας, καταχώρησε την ουσία στη λίστα με τις υπό παρακολούθηση περιβαλλοντικές ενώσεις που προκαλούν ρύπανση στο νερό των ποταμών που διασχίζουν την Αυστρία. Μια μέγιστη ανεκτή συγκέντρωση των 10 µg/L έχει καθιερωθεί ως «περιβαλλοντικός στόχος ποιότητας» για τα ποτάμια νερά της Αυστρίας (Schuhmacher *et al.*, 2005). Ένας από τους τρόπους απομάκρυνσης της 1,3-DCP είναι η οξείδωσή της κατά την προσθήκη H₂O₂, σύμφωνα με την αντίδραση $1,3\text{DCP} + 7 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 3\text{CO}_2 + 2\text{HCl} + 9\text{H}_2\text{O}$ (Nikolaki *et al.*, 2006).

1.4.9.2 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση στην 1,3-DCP διαμέσου των τροφίμων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση σε σχέση με τη δυνητική εμβρυοτοξικότητά της αποτελεί προτεραιότητα για την έρευνα (L'Huillier *et al.*, 2002). Τα στοιχεία των αναλύσεων στα τρόφιμα και προϊόντα αυτών σχετικά με την 1,3-DCP αλιεύθηκαν από αρκετές χώρες. Η 1,3-DCP βρέθηκε σε δείγματα από σάλτσα σόγιας, σε δείγματα συστατικών όπως είναι οι όξινα υδρολυμένες φυτικές πρωτεΐνες και τα προϊόντα βύνης (WHO, 2006, L'Huillier *et al.*, 2002). Αποτελεί μια δυνητική επιμόλυνση για τα τρόφιμα που περιέχουν στα συστατικά τους τις πρωτεΐνες acid-HVP (MUT/01/06). Τρόφιμα ειδικής μέριμνας είναι η σόγια και οι σάλτσες της Ανατολής, όπου η προσθήκη των acid-HVP, ως ενισχυτικό γεύσης, επιταχύνει τη διαδικασία ζύμωσης (MUT/01/06). Τα επίπεδα έκθεσης στην 1,3-DCP εκτιμήθηκαν σε συγκεντρώσεις <0,005 – 4,28 mg/kg (MUT/01/06).

Η 1,3-DCP ανιχνεύθηκε σε δείγματα τροφίμων παρουσία της 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλης. Τα στοιχεία αποδεικνύουν συσχέτιση της 1,3-DCP με τις υψηλές συγκεντρώσεις της 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλης. Οι συγκεντρώσεις της τελευταίας είναι περίπου 50 φορές υψηλότερες από εκείνες της 1,3-DCP. Είναι αναγκαία η συλλογή πρόσθετων στοιχείων που να επιβεβαιώνουν τη συσχέτιση, προτού χρησιμοποιηθούν μοντέλα υπολογισμού των συγκεντρώσεων της 1,3-DCP από τις συγκεντρώσεις της 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλης.

Εκτιμήσεις πρόσληψης από ποικίλες πηγές τροφίμων που περιλαμβάνουν τη σάλτσα σόγιας και τα προϊόντα της ευρύνονται από 0,008 σε 0,051 μg/kg bw, ημερησίως, για το μέσο όρο του γενικού πληθυσμού. Για τους καταναλωτές σε ένα υψηλό ποσοστό (95%), οι εκτιμήσεις πρόσληψης διευρύνονται σε 0,025 - 0,136 μg/kg bw, ημερησίως. Είναι εφικτή, μια εκτίμηση δυνητικής διατροφικής έκθεσης για τους λαούς της Ανατολής μέσα από τη συνιστώμενη ποσότητα των 15 ml στη σάλτσα σόγιας ανά μερίδα (MUT/01/06). Το πρότυπο της Ε.Ε. (CEN) προτείνει για τα κροκιδωτικά από πολυαμινή που χρησιμοποιούνται στην προκατεργασία του νερού περιορισμό της συγκέντρωσης τους στα 500 ppm, ως το μέγιστο επίπεδο επιμόλυνσης από την παρουσία της 1,3-DCP (MUT/01/06).

1.4.10 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ

Αρχικά, η επιτροπή του παγκόσμιου οργανισμού υγείας, WHO, στην 41^η σύσκεψή της, αξιολογώντας την ουσία, την κατέταξε στις ανεπιθύμητες ουσίες στα τρόφιμα. Εκτίμησε ότι η συγκέντρωσή της πρέπει να μειωθεί στη βέλτιστη, τεχνικώς, εφικτή τιμή (WHO, 2006,

WHO, 2002). Για την επαναξιολόγηση της 1,3-DCP, κατά την 57^η σύσκεψη, ήταν διαθέσιμες ελάχιστες έρευνες σχετικά με την κινητική και το μεταβολισμό και λιγοστές μακροπρόθεσμες και βραχυπρόθεσμες έρευνες για την τοξικότητα και την τοξικότητα αναπαραγωγής (WHO, 2006). Ωστόσο, απέδειξαν με σαφήνεια ότι η 1,3-DCP είναι ηπατοτοξική και νεφροτοξική επειδή προκάλεσε την ανάπτυξη όγκων σε διάφορα όργανα στους αρουραίους όπως επίσης και γονιδιοτοξική, *in vitro* (WHO, 2006).

Μια εκτίμηση των επιπέδων της 1,3-DCP στο πόσιμο νερό, από το DWI, θα μπορούσε να είναι 1,25 µg/L (όταν η 1,3-DCP προέρχεται από τα κροκιδωτικά που προστίθενται στη μέγιστη δοσολογία κατά την κατεργασία του πόσιμου νερού) (MUT/01/06). Βάσει ενδεικτικών στοιχείων, η επιτροπή έκρινε ότι θα ήταν άτοπο να εκτιμήσει μια ανεκτή πρόσληψη της 1,3-DCP. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της μακροπρόθεσμης έρευνας σχετικά με την τοξικότητα και την καρκινογένεση έδειξαν σημαντικές αυξήσεις στα επεισόδια ήπιων και θανατηφόρων νεοπλασμάτων σε τουλάχιστον τρεις διαφορετικούς ιστούς. Αναμφισβήτητα, αποδείχθηκε ότι η ουσία μπορεί να αλληλεπιδρά με τα χρωμοσώματα και/ή με το DNA. Αφενός οι δοκιμές περιορίστηκαν σε βακτήρια και θηλαστικά *in vitro* και αφετέρου δεν υπήρξαν στοιχεία σε οργανισμούς θηλαστικών ή ανθρώπους (WHO, 2002). Η δοσολογία που προκάλεσε όγκους στους αρουραίους (19 mg/kg bw ημερησίως) ήταν περίπου 20.000 φορές μεγαλύτερη από την υψηλότερη εκτιμημένη πρόσληψη της 1,3-DCP από ανθρώπους που κατανάλωναν σάλτσα σόγιας (1 µg/kg bw, ημερησίως) (WHO, 2006).

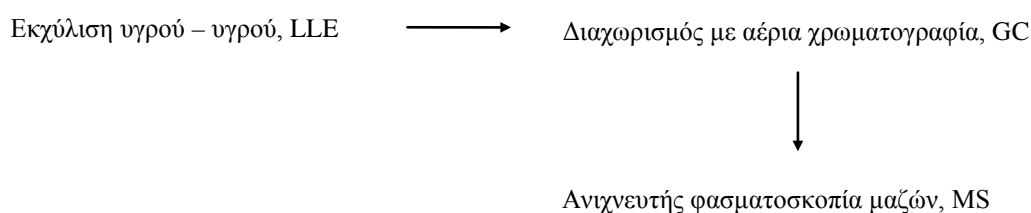
1.4.11 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Η 1,3-DCP μπορεί να ανιχνευτεί με την εφαρμογή της GC-MS με τη διαδικασία δειγματοληψίας υπερκείμενης φάσης (HS-GC-MS) (WHO, 2007). Οι Matthew και Anastasio (NTP, 2005), ανέπτυξαν μια μέθοδο για τον προσδιορισμό της ουσίας παρουσία και άλλων αλοϋδρινών, αφού προηγήθηκε παραγωγοποίηση των αλοϋδρινών στα εκχυλίσματα από τα δείγματα νερού με διαλύτη επταφθοροβουτυρικό οξύ και επακόλουθο διαχωρισμό με GC-ECD. Το όριο ανίχνευσης της ουσίας ήταν 1,7 µg/L σε ένα δείγμα όγκου 5 mL (NTP, 2005).

Υπάρχουν αρκετές αναλυτικές μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό της 1,3-DCP στο χαρτί, στα συστατικά τροφίμων, βιολογικά υγρά και το νερό. Παρόλο που η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκε ολωσδιόλου ως χρωματογραφική μέθοδος διαχωρισμού, οι διάφορες αναλυτικές διαδικασίες διαφέρουν κυρίως στην εκχύλιση, την προετοιμασία του δείγματος και τις τεχνικές ανίχνευσης του τελικού σημείου. Η τελική ανίχνευση της ουσίας πραγματοποιείται, κυρίως, από τον ανιχνευτή δέσμευσης ηλεκτρονίων και τη φασματοσκοπία

μαζών. Για το νερό και τις σάλτσες σόγιας, όλες οι μέθοδοι που στηρίζονται στην υγρή εκχύλιση εφαρμόζουν πρόσθετες προ-χρωματογραφικές βαθμίδες παραγωγοποίησης για να διαμορφώσουν την υδροξυλική ομάδα και να αποδώσουν τα επταφθοροβουτυρικά ή σιλυλαιθερικά παράγωγα.

Η προτεινόμενη μέθοδος ανάλυσης της 1,3-DCP στο ποτάμιο νερό, εκτός από την ευαισθησία και ακρίβειά της, είναι απλή και σαφής. Σχηματικά, η πορεία της αναλυτικής μεθόδου περιγράφεται ακολούθως:



Σχήμα 7: Πορεία ανάλυσης της 1,3-DCP με τη μέθοδο LLE-GC-MS (Schuhmacher *et al.*, 2005)

1.5 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

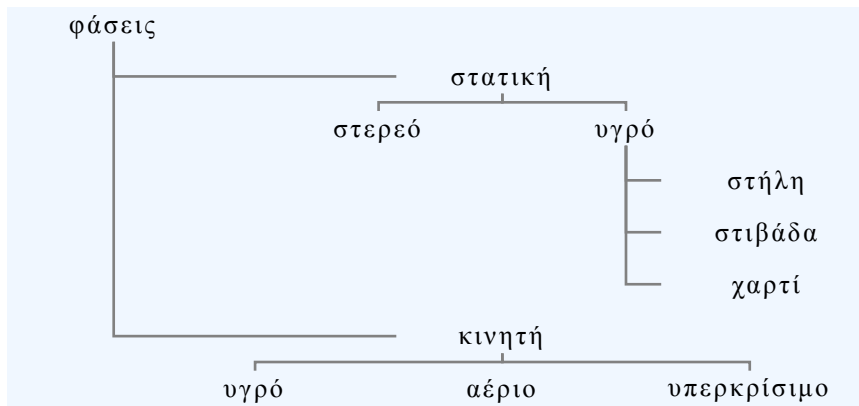
1.5.1 ΓΕΝΙΚΑ

Σκοπός της αναλυτικής χημείας είναι ο προσδιορισμός της ταυτότητας και της ποσότητας των χημικών σωματιδίων σε ένα δείγμα. Ο βαθμός δυσκολίας για την επίτευξη του σκοπού αυτού εξαρτάται από το είδος του δείγματος και την πολυπλοκότητά του. Κατά κύριο λόγο η Αναλυτική Χημεία καλείται να δώσει απάντηση ως προς το χημικό χαρακτηρισμό πολύπλοκων φυσικών δειγμάτων (τρόφιμα, βιολογικά υγρά, υλικά, ύδατα κ.ά) στα οποία συνυπάρχει πλήθος χημικών ενώσεων. Η παρουσία και άλλων συστατικών, πλέον του προσδιοριζόμενου, πολλές φορές δημιουργεί σοβαρά προβλήματα στον προσδιορισμό του, λόγω κοινών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών αυτών με το προσδιοριζόμενο συστατικό. Η ικανότητα των μεθόδων να επιλέγουν προσεκτικά (εκλεκτικότητα) το προσδιοριζόμενο συστατικό (αναλύτη) είναι περιορισμένη. Γενικά οι αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού δεν είναι εκλεκτικές με αποτέλεσμα να προσδιορίζουν και τα συνυπάρχοντα συστατικά τα οποία ονομάζονται παρεμποδιστές (interference). Οι μέθοδοι διαχωρισμού που έχουν αναπτυχθεί εφαρμόζονται για την άρση του προβλήματος της συνύπαρξης των παρεμποδιστών με τον αναλύτη.

Η χρωματογραφία εφευρέθηκε και εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1906 από το ρώσο χημικό M. S. Twsett. Ο Twsett κατάφερε να διαχωρίσει τις χρωστικές των πράσινων φύλλων σε καροτένια και χλωροφύλλες. Ονόμασε τη νέα μέθοδο χρωματογραφία, επειδή κατά το διαχωρισμό εμφανίστηκαν κίτρινες και πράσινες ζώνες, τα καροτένια και οι χλωροφύλλες, αντίστοιχα. Ο Τσβετ πραγματοποίησε το διαχωρισμό των χρωστικών ουσιών των πράσινων φύλλων, αφού πρώτα διέλυσε το εκχύλισμά τους σ' έναν οργανικό διαλύτη και κατόπιν άφησε το διάλυμα να διαρρέυσει μέσω ενός κατακόρυφου σωλήνα γεμισμένου με κονιοποιημένη κιμωλία. Οι διάφορες χρωστικές διέρχονταν από τη στήλη αυτή με διαφορετική ταχύτητα, σχηματίζοντας μια σειρά χρωματισμένων ταινιών στη λευκή κιμωλία της στήλης.

Σύμφωνα με τον ορισμό που δίνει η IUPAC, η χρωματογραφία αποτελεί μέθοδο καθαρισμού και διαχωρισμού των συστατικών ενός μίγματος, η οποία στηρίζεται στο βαθμό προσρόφησης των διαφόρων ουσιών σε δυο μη αναμιγνυόμενες φάσεις οι οποίες βρίσκονται σε σχετική κίνηση η μια ως προς την άλλη. Η φάση που κινείται ονομάζεται «κινητή» ενώ η ακίνητη φάση που βρίσκεται μέσα στη χρωματογραφική στήλη ονομάζεται «στατική». Η διαδικασία κατά την οποία η κινητή φάση, μαζί με το μίγμα διαχωρισμού, διέρχεται από τη στατική φάση καλείται έκλουση. Μετά την έκλουση τα διάφορα συστατικά εξέρχονται διαδοχικά από τη στήλη σε διαφορετικό χρόνο το καθένα, ταυτοποιούνται και προσδιορίζονται ποσοτικά. Με τον τρόπο αυτό λαμβάνεται, τελικά, το χρωματογράφημα στο οποίο είναι καταγεγραμμένες οι διάφορες κορυφές των συστατικών σε συνάρτηση με το χρόνο εξόδου τους από τον ανιχνευτή.

Η κινητή φάση σε υγρή μορφή καλείται εκλουστικό ενώ η αέρια φέρον αέριο. Αντίθετα, η στατική φάση μπορεί να είναι είτε ένα πορώδες ή κοκκώδες στερεό είτε λεπτό υμένιο υγρού το οποίο είναι προσροφημένο πάνω σε ένα στρώμα στερεού.



Σχήμα 8: Διάφορες μορφές των δυο φάσεων, στατικής και κινητής, που οδηγούν σε διαφορετικά είδη χρωματογραφικών τεχνικών

1.5.2 ΕΙΔΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

Μέχρι σήμερα, έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές χρωματογραφίας μεγάλης διαχωριστικής ικανότητας. Ανάλογα με το μίγμα που πρόκειται να διαχωριστεί επιλέγεται κάθε φορά η καταλληλότερη τεχνική. Διακρίνονται διάφορα είδη χρωματογραφικών τεχνικών (Παράρτημα, Πίνακας 19), οι κυριότερες από τις οποίες είναι:

- υγρή χρωματογραφία, LC
- αέρια χρωματογραφία, GC
- χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, TLC
- χρωματογραφία στήλης
- υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, HPLC

1.5.3 ΑΡΧΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

Οι χρωματογραφικές τεχνικές δε διαφέρουν πολύ καθότι διέπονται από μια κοινή αρχή. Γενικά, ο διαχωρισμός μίγματος συστατικών, με χρωματογραφικές τεχνικές είναι αποτέλεσμα διαφορετικών διεργασιών μεταφοράς – μετακίνησής τους στο σύστημα των δυο μη αναμιγνυόμενων φάσεων, της στατικής και της κινητής (Παπαδογιάννης, 2001). Η αρχή στην οποία βασίζονται όλες περιλαμβάνει τη διάλυση του προς διαχωρισμό μίγματος σε κατάλληλο διαλύτη δηλαδή την κινητή φάση και στη συνέχεια τη διέλευση του μίγματος διαμέσου ενός προσροφητικού υλικού δηλαδή τη στατική φάση. Επειδή διαφορετικές ενώσεις προσροφώνται στη στατική φάση σε διαφορετική έκταση, μετακινούνται διαμέσου

της φάσης με διαφορετικές ταχύτητες και διαχωρίζονται καθώς εξέρχονται (εκλούνται) από το άκρο της χρωματογραφικής πλάκας. Η ταχύτητα μετακίνησης εξαρτάται από την ισορροπία και τη συγγένεια του συστατικού για τις δυο φάσεις και επομένως από τη χημική δομή και το είδος των φυσικοχημικών δυνάμεων που επικρατούν στο χρωματογραφικό σύστημα (Παπαδογιάννης, 2001). Οι χημικές δυνάμεις αναφέρονται στο σχηματισμό χημικών δεσμών και εξαρτώνται από τη χημική δομή των ενώσεων. Οι φυσικές δυνάμεις που αναπτύσσονται σε ένα χρωματογραφικό διαχωρισμό είναι κυρίως ηλεκτροστατικές και εξαρτώνται από την πολικότητα ή πολωσιμότητα των ενώσεων (Παπαδογιάννης, 2001).

1.6 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

1.6.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η αέρια χρωματογραφία ανήκει στις μεθόδους διαχωρισμού και εφαρμόζεται κυρίως σε αναλυτική κλίμακα (ποσότητες δειγμάτων μικρότερες των $10^{-6}\text{g} = 1\mu\text{g}$). Οι προς διαχωρισμό ενώσεις πρέπει να είναι ή να καθίστανται πτητικές και θα πρέπει να μεταβαίνουν στην αέρια φάση χωρίς ταυτόχρονη διάσπαση. Η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ταυτότητας (ποιοτική ανάλυση) και της ποσότητας (ποσοτική ανάλυση) των ενώσεων. Ωστόσο η εν λόγω μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως μέθοδος απομόνωσης ενός συστατικού από ένα μίγμα στην καθαρή του μορφή (preparative chromatography). Η αέρια χρωματογραφία εξελίχθηκε σε αναλυτική τεχνική τα τελευταία σαράντα χρόνια και εφαρμόζεται για τον διαχωρισμό πτητικών ουσιών, διότι παρουσιάζει υψηλή ταχύτητα, ικανότητα υψηλής απόδοσης και ευκολία στη χρήση. Χρησιμοποιείται σήμερα για την ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα, προϊόντα πετρελαίου, βιομηχανίες αρωματοποιίας κτλ.

1.6.2 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Κατόπιν της παρουσίασης του πρώτου συστήματος αέριας χρωματογραφίας, το 1952, από τους James και Martin και τις διαδοχικές εξελίξεις που δέχτηκε, η μορφή που απέκτησε αποτυπώνεται στο σχήμα (Σχήμα 9). Σε γενικές γραμμές, ο αέριος χρωματογράφος αποτελείται από δυο τμήματα:

1. το τμήμα διαχωρισμού: το φέρον αέριο μαζί με το κύριο μέρος του χρωματογράφου, όπου γίνεται ο διαχωρισμός

2. το τμήμα ανάλυσης: το σύστημα ανίχνευσης, καταγραφής και αποτίμησης του σήματος

Το κύριο μέρος του χρωματογράφου είναι η στήλη. Οι στήλες που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία είναι συνήθως γυάλινες ή χαλύβδινες στήλες γεμισμένες με διάφορα υλικά ανάλογα με τα συστατικά που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε. Το σχήμα τους έχει τη μορφή έλικας και η διάμετρός τους είναι πάρα πολύ μικρή. Σήμερα χρησιμοποιούνται τριχοειδείς γυάλινες στήλες μήκους μέχρι 60 m, οι οποίες εσωτερικά είναι καλυμμένες με διάφορα υλικά.

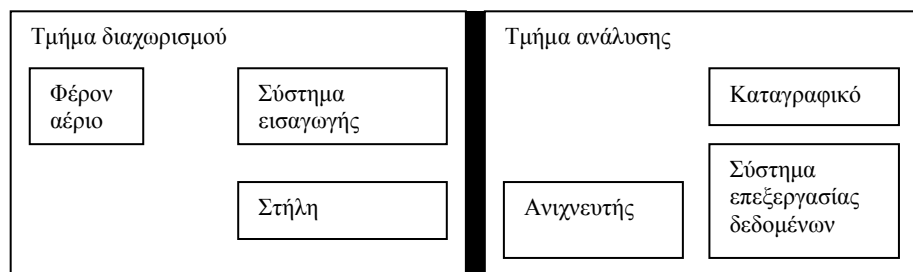
Το δεύτερο μέρος του χρωματογράφου περιλαμβάνει τον ανιχνευτή, ο οποίος τοποθετείται στο τέλος της στήλης, ανιχνεύει τα διάφορα συστατικά και δίνει ηλεκτρικά σήματα. Τα σήματα ενισχύονται και καταγράφονται στο καταγραφικό σύστημα, το οποίο είναι συνδεδεμένο με μικροϋπολογιστή. Ειδικότερα, το κυρίως σώμα ενός συστήματος αέριας χρωματογραφίας αποτελούν

1. το φέρον αέριο
2. ο έλεγχος ροής
3. η είσοδος δείγματος και οι συσκευές αυτόματης δειγματοληψίας
4. οι περιοχές ελεγχόμενης θερμοκρασίας
5. οι ανιχνευτές
6. το καταγραφικό σύστημα

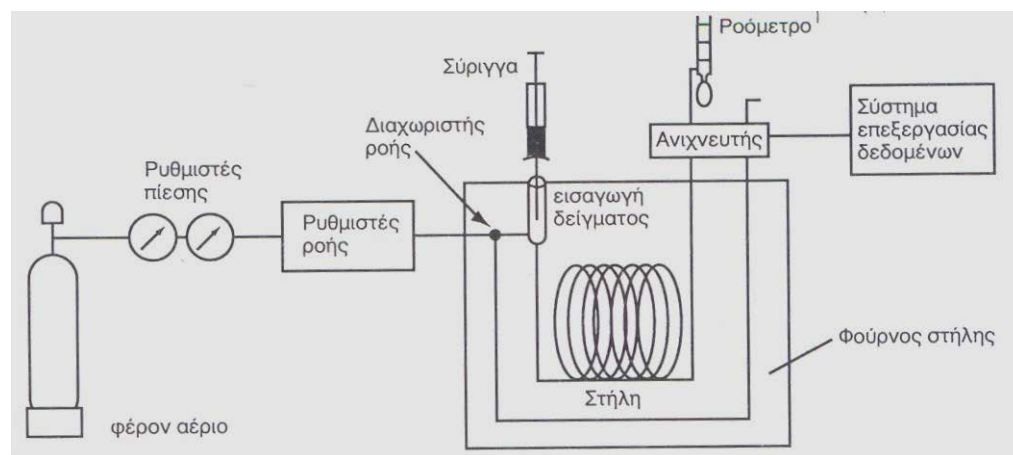
Συνοπτικά, ένας αέριος χρωματογράφος λειτουργεί ως ακολούθως: το αδρανές φέρον αέριο (όπως είναι το ήλιο) ρέει αδιάκοπα από έναν μεγάλης χωρητικότητας κύλινδρο αερίου διαμέσου του σημείου εισαγωγής, της στήλης και του ανιχνευτή. Ο ρυθμός ροής του φέροντος αερίου ελέγχεται προσεκτικά για να επιβεβαιωθούν οι χρόνοι κατακράτησης και να ελαχιστοποιηθεί η μεταβολή σήματος και ο θόρυβος. Το δείγμα εκχύνεται (συνήθως διαμέσου μιας μικροσύριγγας) στο θερμαινόμενο σημείο εισαγωγής όπου εξατμίζεται και μεταφέρεται μέσα στη στήλη. Ενδεικτικά αναφέρεται μια στήλη με μήκος 15 έως 30 μέτρα επικαλυμμένη, εσωτερικά, με ένα λεπτό (0,2 μm) στρώμα ή με υγρά υψηλού σημείου ζέσεως. Το επικαλυμμένο λεπτό στρώμα αποτελεί τη στατική φάση του αέριου χρωματογράφου. Το δείγμα κατανέμεται μεταξύ της κινητής και στατικής φάσης και διαχωρίζεται σε μεμονωμένα συστατικά βάσει της σχέσης διαλυτότητας στην υγρή φάση και της σχετικής τάση ατμών (McNair, 1998). Το δείγμα όγκου 1μL εισάγεται στο ρεύμα του φέροντος αερίου στην αρχή της στήλης με μια μικροσύριγγα, διαμέσου μιας ελαστικής πλακέτας ή ενός διαφράγματος ή μιας βαλβίδας. Η ταχύτητα και η ικανότητα διαχωρισμού εξαρτώνται από τη θερμοκρασία με

συνέπεια να απαιτείται η τοποθέτηση της στήλης μέσα σε φούρνο ακριβείας με αυστηρά επαναλήψιμες συνθήκες.

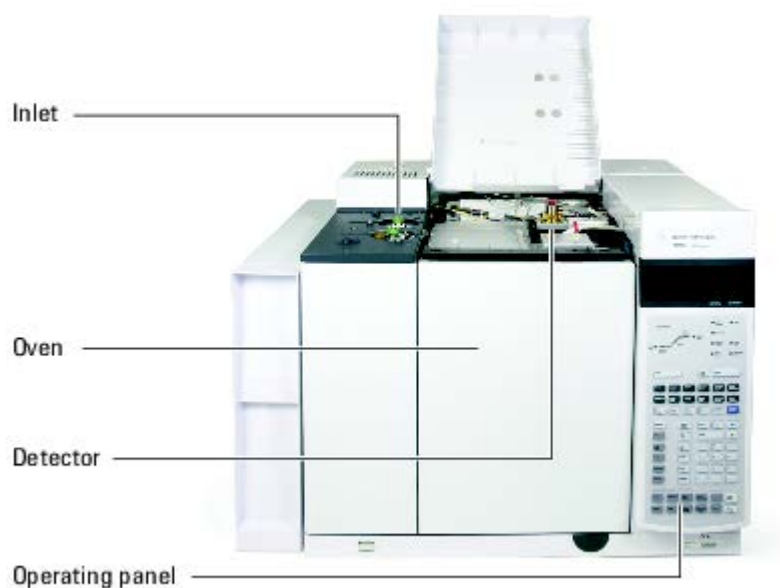
Μετά τη στήλη, το φέρον αέριο και το δείγμα περνά διαμέσου ενός ανιχνευτή. Το όργανο μετρά την ποσότητα του δείγματος και παράγει ένα ηλεκτρικό σήμα. Αυτό το σήμα μεταβιβάζεται σε ένα καταγραφικό σύστημα ή ολοκληρωτή που με τη σειρά του παράγει το χρωματογράφημα δηλαδή την έγγραφη αναφορά της ανάλυσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις το σύστημα χειρισμού δεδομένων ολοκληρώνει την περιοχή της κορυφής, υπολογίζει και τυπώνει μια αναφορά με τα ποσοτικοποιημένα αποτελέσματα και τους χρόνους συγκράτησης (McNair, 1998).



Σχήμα 9: Κύρια τμήματα αέριου χρωματογράφου. Στο τμήμα Α λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός και στο τμήμα Β η ανάλυση.



Σχήμα 10: Διάταξη αέριου χρωματογράφου (Παπαδογιάννης, 2001)



Σχήμα 11: Πρόσοψη διάταξης GC-MS (Agilent)

1.6.3 ΦΕΡΟΝ ΑΕΡΙΟ

Ο πρωτεύων σκοπός του φέροντος αερίου είναι να μεταφέρει το δείγμα διαμέσου της στήλης. Αποτελεί την αποκαλούμενη κινητή φάση, είναι αδρανής και δεν αλληλεπιδρά χημικά με το δείγμα. Ένας δευτερεύων σκοπός είναι να παρέχει στον ανιχνευτή μια κατάλληλη μήτρα για τη μέτρηση των ουσιών του δείγματος. Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται κυρίως από τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιούμε.

Το φέρον αέριο από τη φιάλη υψηλής πίεσης, μέσα από ρυθμιστές παροχής, οδηγείται στη στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της στήλης. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης και διαχωρίζονται. Τα κλάσματα στη συνέχεια ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή και τα σήματα της ανίχνευσης καταγράφονται από το καταγραφικό ή οδηγούνται σε μικροϋπολογιστή. Σε ορισμένες περιπτώσεις, στη συνέχεια υπάρχει μια διάταξη, όπου συλλέγονται τα διάφορα κλάσματα και τέλος ένα ροόμετρο για τον έλεγχο της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου. Ως φέρον αέριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αέριο σε υπερκαθαρή κατάσταση, το οποίο μπορεί να διαχωριστεί στον ανιχνευτή από τα διάφορα συστατικά του μίγματος. Έτσι, ως φέροντα αέρια μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε ήλιο, αργό, άζωτο και υδρογόνο (Παράρτημα, Πίνακας 16).

Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές και απαλλαγμένο από προσμίξεις. Επίσης πρέπει να έχει εκδιωχθεί το οξυγόνο, γιατί οξειδώνει τη στατική φάση και αυτό σημαίνει καταστροφή της στήλης, ιδιαίτερα όταν αυτή είναι τριχοειδής και η ποσότητα της στατικής φάσης είναι ελάχιστη. Ίχνη υγρασίας επίσης απενεργοποιούν τη στατική φάση, για το λόγο αυτό το φέρον αέριο πρέπει να είναι τελείως απαλλαγμένο από υγρασία. Επιπρόσθετα, ίχνη υγρασίας μπορούν να εκροφήσουν ανεπιθύμητες προσμίξεις της στήλης (contaminant), να παράγουν ένα υψηλό σήμα υποβάθρου στον ανιχνευτή ή ακόμη και φανταστικές κορυφές. Η παροχή του φέροντος αερίου ρυθμίζεται με ειδικές βαλβίδες και ροόμετρα (Παπαδογιάννης 2001).

1.6.4 ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η αποτελεσματικότητα της στήλης απαιτεί το εισαχθέν δείγμα να είναι κατάλληλου μεγέθους και να εισάγεται ως μικρού εύρους ζώνη. Για την πρόληψη μεταβολής των κορυφών και απώλειας της διαχωριστικής ικανότητας του συστήματος, το δείγμα πρέπει να εισάγεται κατά μεγάλη ποσότητα και γρήγορα. Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι τρόποι εισαγωγής δείγματος είναι η χρήση μικροσύριγγας και βαλβίδας. Η εύρυθμη λειτουργία του συστήματος εισαγωγής του δείγματος επιτυγχάνεται με έλεγχο της θερμοκρασίας και με τα αδρανή υλικά κατασκευής. Η περιοχή στην οποία εισάγεται το δείγμα χρειάζεται να διατηρείται σε υψηλή θερμοκρασία έτσι ώστε το δείγμα να ατομοποιείται ταχέως. Για το λόγο αυτό η θερμοκρασία του εισαγωγέα είναι συνήθως περίπου κατά 50⁰C υψηλότερη από το σ.ζ. του λιγότερο πτητικού συστατικού του δείγματος. Ενίοτε όμως χρειάζεται να αποφεύγεται η υπερθέρμανση του εισαγωγέα διότι ενδέχεται να εκλυθούν αέριες προσμίξεις από το ελαστικό διάφραγμα του εισαγωγέα (septum). Μόλις πραγματοποιηθεί ασφαλής εισαγωγή δείγματος, τα προς διαχωρισμό συστατικά του οδεύουν από τον εισαγωγέα προς της στήλη, παρασυρόμενα από την κινητή φάση δηλαδή το φέρον αέριο. Στις τριχοειδείς στήλες η εισαχθείσα ποσότητα του δείγματος ποικίλει από 1 έως 10 μ L (Μπακέας 2008).

1.6.5 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΕ ΤΡΙΧΟΕΙΔΕΙΣ ΣΤΗΛΕΣ

Η εισαγωγή του δείγματος στις τριχοειδείς στήλες πραγματοποιείται κατά δυο τρόπους:

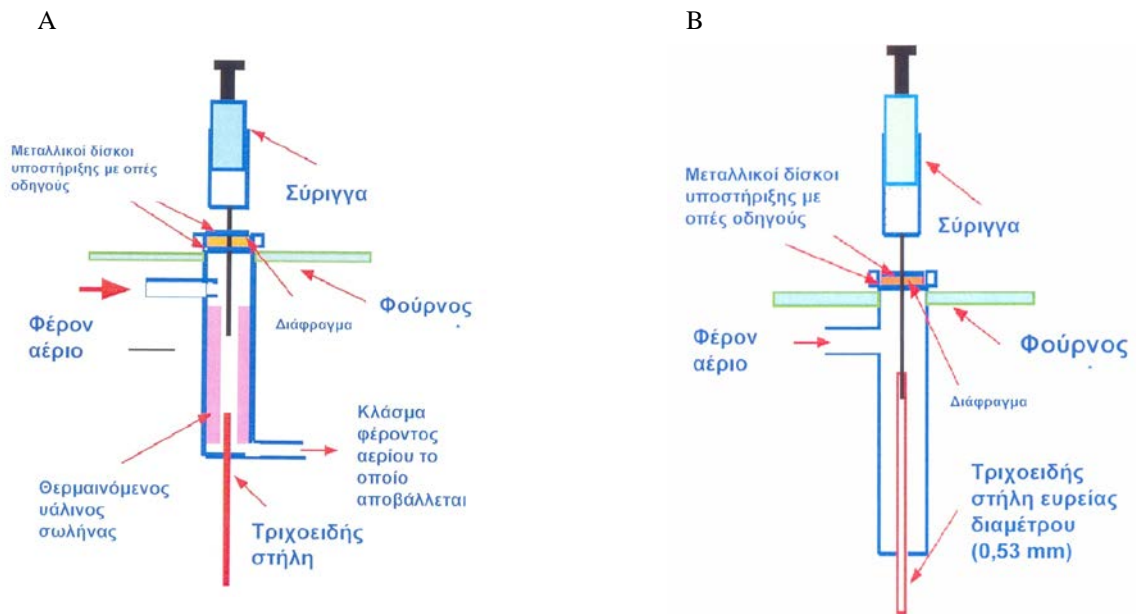
- με εισαγωγή μη διαμοιρασμού
- με εισαγωγή διαμοιρασμού

Εισαγωγή μη διαμοιρασμού (splitless injection): Για την αποφυγή προβλημάτων τα οποία προκύπτουν από τον εισαγωγέα διαμοιρασμού χρησιμοποιούνται τριχοειδείς στήλες μεγαλύτερης διαμέτρου (0,53 mm i.d.) στις οποίες μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της εισαγωγής στην κορυφή της στήλης. Εδώ δεν πραγματοποιείται διαμοιρασμός του φέροντος αερίου και κατά επέκταση του δείγματος. Ο εισαγωγέας αυτός ονομάζεται εισαγωγέας μη διαμοιρασμού (splitless injector). Οι σύγχρονοι εισαγωγείς αποτελούν συνδυασμό των δυο προηγούμενων εισαγωγέων (split/splitless injection). Το δείγμα διαλύεται σε ένα πτητικό διαλύτη (όπως εξάνιο, μεθανόλη) και ακολούθως 1 έως 5 μL εισάγονται στο θερμαινόμενο εισαγωγέα. Το δείγμα εξατμίζεται και σταδιακά, με ρυθμό ροής περίπου 1ml/min, μεταφέρεται πάνω στην ψυχρή στήλη όπου ο διαλύτης μαζί με το δείγμα συμπυκνώνονται. Μετά από 45 δευτερόλεπτα, η βαλβίδα διαμοιρασμού ανοίγει με ρυθμό ροής περίπου 50ml/min και τυχόν υπολείμματα εξάτμισης που παρέμειναν στο σημείο εισαγωγής σαρώνονται από το σύστημα. Η εξαέρωση του διαφράγματος είναι σημαντική στις εισαγωγές splitless (McNair, 1998).

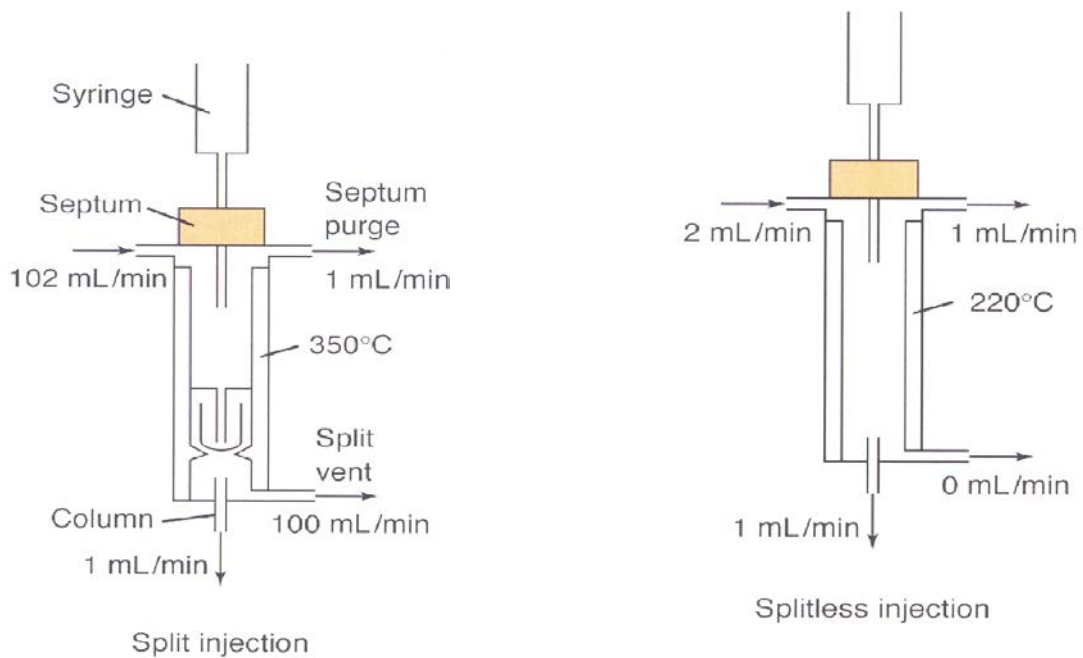
Η στήλη έχει θερμοκρασιακό πρόγραμμα και πρωταρχικά εξατμίζεται μόνο ο πτητικός διαλύτης και μεταφέρεται έξω από τη στήλη. Καθώς συμβαίνει η εξάτμιση του διαλύτη, οι αναλύτες του δείγματος επανασυγκεντρώνονται μέσα σε μια στενή δέσμη στον υπόλοιπο διαλύτη. Κάποια στιγμή αργότερα, οι αναλύτες εξατμίζονται στη θερμή στήλη και διαχωρίζονται. Παρατηρείται υψηλή απόδοση των αναλυτών με τα υψηλότερα σημεία ζέσεως. Το πλεονέκτημα της εισαγωγής splitless έναντι της split είναι η βελτιωμένη ευαισθησία. Τα αποτελέσματα της splitless ικανοποιούν την ιχνοανάλυση σε περιβαλλοντικά, φαρμακευτικά ή βιοχημικά δείγματα. Ωστόσο η splitless εισαγωγή έχει ορισμένα μειονεκτήματα. Είναι χρονοβόρα, απαιτεί ψυχρή στήλη στην αρχή και έχει θερμοκρασιακό πρόγραμμα. Είναι απαραίτητη η διάλυση του δείγματος σε έναν πτητικό διαλύτη, η αρχική θερμοκρασία στήλης και ο χρόνος ανοίγματος της βαλβίδας split χρήζουν βελτιστοποίησης. Εν κατακλείδι, δεν είναι κατάλληλη για πτητικές ουσίες.

Εισαγωγή διαμοιρασμού (split injection): Στη split εισαγωγή η βαλβίδα διαμοιρασμού είναι ανοικτή ενώ στη splitless εισαγωγή παραμένει κλειστή. Οι τριχοειδείς στήλες μπορούν να δεχθούν μικρές ποσότητες δείγματος και για αυτό απαιτείται ένα σύστημα εισαγωγής διαμοιρασμού (split injection). Η βασική διαφορά με τον προηγούμενο εισαγωγέα splitless είναι ότι η τριχοειδής στήλη εισέρχεται στο γυάλινο σωλήνα και ένα μέρος του φέροντος αερίου περνά από την κορυφή της στήλης και αποβάλλεται χωρίς να εισέρχεται σε αυτήν (split). Καθώς το δείγμα περνά από την κορυφή της στήλης κλάσμα αυτού εισέρχεται σε αυτήν (split injector). Η αναλογία διαμοιρασμού ρυθμίζεται με ρύθμιση του κλάσματος

του φέροντος αερίου το οποίο αποβάλλεται. Τυπική αναλογία διαμοιρασμού η οποία χρησιμοποιείται είναι η 1:100 με το 99% του δείγματος να αποβάλλεται στην ατμόσφαιρα.



Εικόνα 2: Σύστημα εισαγωγής δείγματος A μη διαμοιρασμού B διαμοιρασμού (Μπακέας, 2008)



Εικόνα 3: Αντιπροσωπευτικές συνθήκες εισαγωγής για εισαγωγέα διαμοιρασμού (split), εισαγωγέα μη διαμοιρασμού (splitless) (Μπακέας, 2008)

1.6.6 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ GC

Η αέρια χρωματογραφία συγκεντρώνει αρκετά πλεονεκτήματα που την καθιστούν πολύτιμο εργαλείο της αναλυτικής χημείας και την κατατάσσουν στις ταχείες αναλύσεις. Επιτρέπει να γίνονται αναλύσεις σε δευτερόλεπτα γεγονός που την καθιστά χρήσιμη και εμπορικά. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι για ένα δείγμα ελαίου πορτοκαλιού χρόνος ίσως με 40 λεπτά που χρειάζεται για το διαχωρισμό με μια ειδικά σχεδιασμένη οργανολογία ταχείας ανάλυσης μπορεί να μειωθεί στα 80 δευτερόλεπτα. Είναι αποτελεσματική αφού παρουσιάζει υψηλή διακρισιμότητα (διακριτική ικανότητα). Η υψηλή απόδοση, εκφρασμένη σε αριθμούς θεωρητικών πλακών της στήλης, χαρακτηρίζει τη στήλη στην αέρια χρωματογραφία. Μια θεωρητική πλάκα αντιστοιχεί στο χώρο ή μήκος της στήλης, που απαιτεί μια πλήρης εξισορρόπηση φάσεων. Η αποδοτικότητα μιας στήλης είναι ανάλογη του μήκους της στήλης. Αυτό σημαίνει ότι όσο πιο επιμήκης η στήλη τόσο περισσότερες θεωρητικές πλάκες έχει και τόσο καλύτερος γίνεται ο διαχωρισμός. Συνοπτικά, καλύτερη στήλη θεωρείται εκείνη που κατέχει το μεγαλύτερο αριθμό θεωρητικών πλακών.

Η ευαισθησία σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων δειγμάτων (ppm, ppb, ppt), τα οποία δεν απαιτούν εκτεταμένη προκατεργασία, η αποτελεσματικότητα στο διαχωρισμό πολύπλοκων μιγμάτων στα συστατικά τους, η απλότητα που διακρίνει την οργανολογία της, η ικανότητα σύζευξης με άλλα όργανα (MS), η υψηλή ακρίβεια ποσοτικής ανάλυσης (τυπικά RSDs 1-5%), όπως επίσης και η επάρκεια σε μικρές ποσότητες δείγματος τυπικά μL θεωρούνται ορισμένα από τα πλεονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας. Εντούτοις, η GC μειονεκτεί διότι περιορίζεται από την πτητικότητα των ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, η θερμοκρασία της στήλης περιορίζεται στους $\sim 380^\circ\text{C}$, η $P_{\text{ατμ}}$ του αναλύτη φθάνει τα 60 Torr στη συγκεκριμένη θερμοκρασία στήλης και οι ενώσεις θα πρέπει να έχουν σ.ζ. μικρότερο από 500°C . Επιπρόσθετα, είναι ακατάλληλη για θερμικά ασταθείς ουσίες, τα δείγματα θα πρέπει να είναι διαλυτά και μην αντιδρούν με τη στήλη. Συνήθως, απαιτείται η σύνδεσή της με όργανο που να επιβεβαιώνει την ταυτότητα των κορυφών. Η GC θεωρείται αξιόλογη τεχνική και τα μειονεκτήματα της να εστιάζουν την έρευνα προς ενέργειες εξέλιξής της.

1.7 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ

Φασματομετρία ονομάζεται η μελέτη και ανάλυση των αλληλεπιδράσεων που γίνονται μεταξύ της ύλης και των διαφόρων μορφών ακτινοβολίας (όπως είναι η ορατή, υπεριώδης, υπέρυθη κ.λπ.). Η λέξη φασματομετρία προέρχεται από τη λατινική λέξη για την εμφάνιση. Τα διάφορα είδη φασματομετρίας χρησιμοποιούνται σε ευρεία κλίμακα και βοηθούν στη διευκρίνιση της δομής των διαφόρων ενώσεων σε πολλούς τομείς.

1.8 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

1.8.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η φασματομετρία μαζών είναι μια από τις σημαντικότερες μεθόδους προσδιορισμού της δομής και της σχετικής μοριακής μάζας των οργανικών ενώσεων. Με το φασματογράφο μαζών μπορεί να προσδιοριστεί η M_r μιας ένωσης χρησιμοποιώντας λιγότερο από ένα mg. Συνήθως με τη M_r μπορεί να προσδιοριστεί ο στοιχειώδης μοριακός τύπος με στοιχειακή ανάλυση και συνεπώς ο εμπειρικός τύπος μιας χημικής ένωσης. Στην απλούστερη εκδοχή της, η φασματομετρία μαζών είναι μια τεχνική μέθοδος μέτρησης της μάζας και συνεπώς της σχετικής μοριακής μάζας, M_r , ενός μορίου. Επιπλέον, συχνά, είναι δυνατό να συγκεντρώσουμε πληροφορίες για μια άγνωστη δομή, μετρώντας τη μάζα των θραυσμάτων που προκύπτουν από την αποσύνθεση μορίων υψηλής ενέργειας. Υπάρχουν αρκετά διαφορετικά είδη φασματομέτρων, αλλά περισσότερο διαδεδομένο είναι το όργανο ιοντισμού ηλεκτρονίων με μαγνητικό τμήμα, EI (McMurry, 1998).

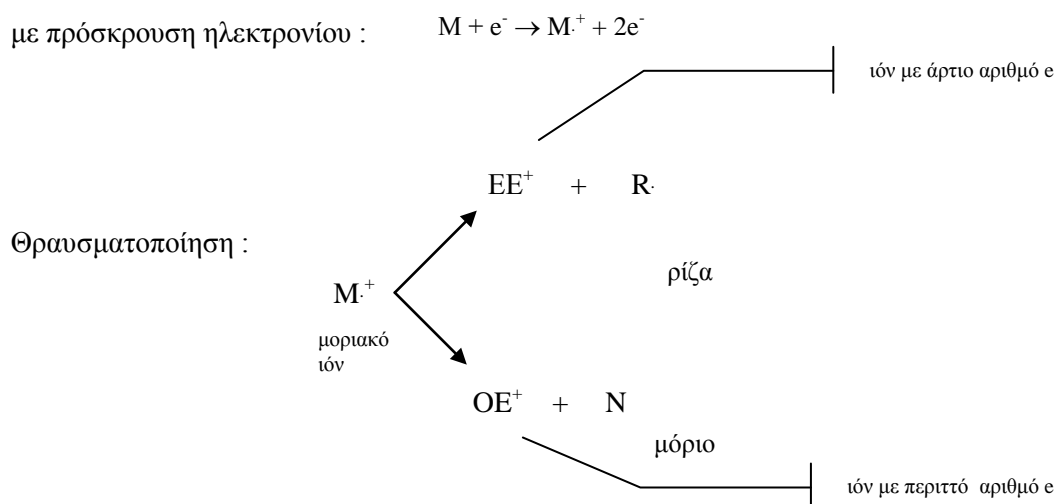
Η αξία της φασματομετρίας μαζών αναδεικνύεται από την πληροφορία που παρέχει το φάσμα μαζών της, ως προς τη σχετική μοριακή μάζα μιας ουσίας αφενός και αφετέρου ως προς τη διάκριση μεταξύ δυο ή περισσότερων χημικών ουσιών. Με τη φασματομετρία μαζών είναι δυνατό να γίνει μελέτη της δομής του μορίου. Υπάρχει πάντοτε ένας αριθμός πιθανών μοριακών τύπων, για όλα τα μόρια εκτός από τις εξαιρετικά χαμηλές σχετικές μοριακές μάζες. Εφόσον είναι γνωστή η σχετική μοριακή μάζα, μπορεί να περιοριστούν σημαντικά οι επιλογές ως προς το μοριακό τύπο. Για παράδειγμα, αν το φάσμα μαζών κάποιας άγνωστης ένωσης έχει μοριακό ιόν $m/z = 110$, οι πιθανοί μοριακοί τύποι είναι C_8H_{14} , $C_7H_{10}O$, $C_6H_6O_2$, $C_6H_{10}N_2$. Διάφορα υπολογιστικά προγράμματα, εξάλλου, είναι σε θέση να καταρτίσουν με μεγάλη ευκολία κάποιον κατάλογο επιλογών όπως π.χ. η ηλεκτρονική βιβλιοθήκη NIST.

Τα νεότερα μηχανήματα φασματομετρίας μαζών έχουν νέα συστήματα κενού, ποικίλες τεχνικές ιοντισμού, μεγάλη διαχωριστική χρωματογραφική ικανότητα, αναλυτές απλής και διπλής εστίασης, θραυσματοποίηση και υψηλής ποιότητας διαχωρισμό μοριακών θραυσμάτων και ποικιλία ανιχνευτών (διαφορικός, υπεριώδους-ορατού, φθορισμού, ηλεκτροχημικός, κ.λπ.). Η καταγραφή του φάσματος γίνεται με εξαιρετική ακρίβεια, επιδέχεται διορθώσεις και με τεράστιες βάσεις δεδομένων μπορεί κανείς να έχει τη σύγκριση της αναζητούμενης δομής των οργανικών ενώσεων που αναλύει (Βαλαβανίδης, 2006).

οποία βομβαρδίζεται το δείγμα αυξάνεται και πέρα των 15 eV, τα μοριακά ιόντα υπόκεινται σε νέα διάσπαση παράγοντας θραύσματα ιόντα που είναι χαρακτηριστικά της μοριακής δομής της οργανικής ένωσης. Έχει βρεθεί ότι με ενέργεια ηλεκτρονίων περίπου 70 eV πραγματοποιείται συστηματική θραυσματοποίηση δεσμών του μορίου, που μπορεί να αναπαραχθεί σε σημαντικό βαθμό. Με ενέργειες ηλεκτρονίων άνω των 70 eV παρατηρείται σχηματισμός ολοένα και αυξανόμενου αριθμού διπλα-φορτισμένων ιόντων, που οφείλεται στην αφαίρεση δυο ηλεκτρονίων από το μόριο ή το μοριακό ιόν του δείγματος (Βαλαβανίδης, 2006). Τα θετικά ιόντα που σχηματίζονται κατά τη θραυσματοποίηση αποβάλλονται από το χώρο ιοντισμού εφαρμόζοντας ηλεκτροστατικό πεδίο με ειδικούς δίσκους που επιταχύνουν τα ιόντα μέσα από τις κεντρικές οπές προς τη σχισμή Α. Τα επιταχυνθέντα ιόντα εισέρχονται στο χώρο του μαγνητικού αναλυτή (πόλοι ενός ισχυρού μαγνήτη) για τον τελικό διαχωρισμό τους ανάλογα με το μοριακό τους βάρος (Βαλαβανίδης, 2006).

Ο μαγνητικός αναλυτής είναι ένα σύστημα ισχυρών μαγνητών που το μαγνητικό του πεδίο διαπερνά το διάδρομο της πορείας των μοριακών και άλλων ιόντων προς μαγνητικό διαχωρισμό. Συνήθως ο μαγνήτης σχηματίζει τοπικό μαγνητικό πεδίο σε σχήμα ανοιχτής βεντάλιας με γωνία 60^0 ή 90^0 , που έχει την ικανότητα να εκτρέπει τα θετικά ιόντα προς το συλλέκτη (Βαλαβανίδης, 2006).

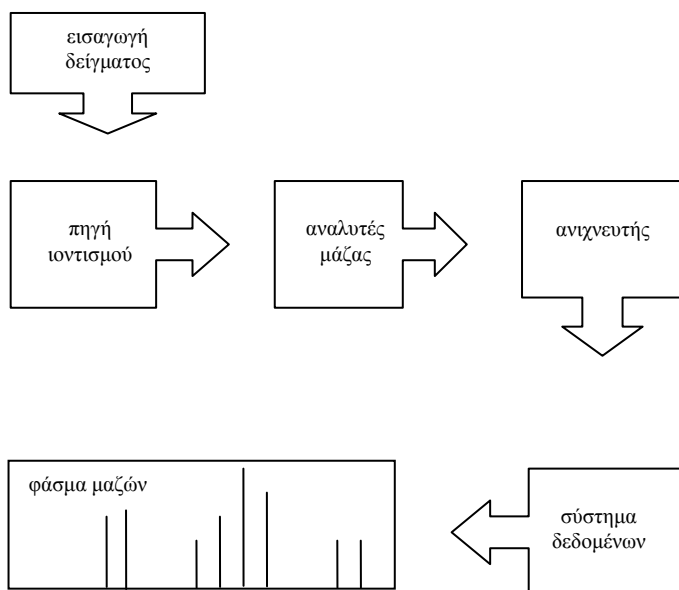
Ιοντισμός



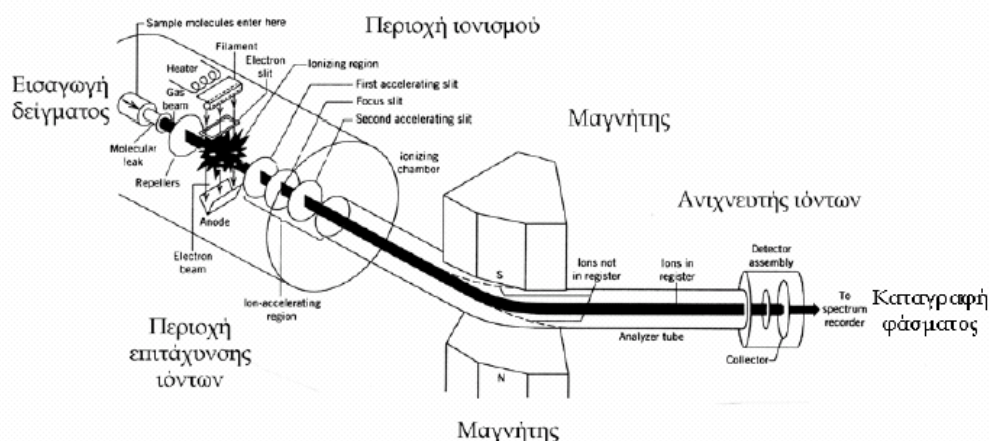
Σχήμα 12: Ιοντισμός ενός μορίου με πρόσκρουση ηλεκτρονίων, EI, προς σχηματισμό μοριακού ιόντος και θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος

1.8.3 ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΣ ΜΑΖΩΝ, MS

Ο Φασματογράφος Μαζών, MS, είναι ένα όργανο που με τη βοήθεια ηλεκτρονικού βομβαρδισμού κατακερματίζει την ουσία που μελετάται παράγοντας ιόντα. Τα ιόντα αυτά επιταχύνονται με τη βοήθεια ισχυρού μαγνητικού πεδίου και συλλέγονται από τον ανιχνευτή σε διαστήματα ανάλογα με τη σχετική μοριακή μάζα τους. Τα τμήματα που συνθέτουν έναν MS απεικονίζονται στο Σχήμα 13.



Σχήμα 13: Τα βασικά τμήματα ενός φασματογράφου μάζας (McNair, 1998)



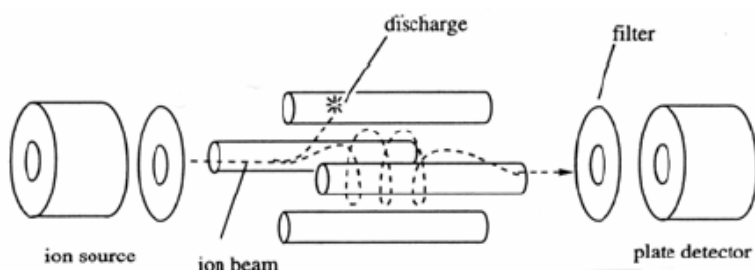
Σχήμα 14: Φασματογράφος μαζών. Σχηματική αναπαράσταση από την εισαγωγή του δείγματος, την περιοχή ιοντισμού, επιτάχυνσης και διαχωρισμού των θραυσμάτων-ιόντων με την επίδραση μαγνητικού πεδίου (Βαλαβανίδης, 2006)

1.8.4 ΤΥΠΟΙ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΩΝ ΜΑΖΩΝ

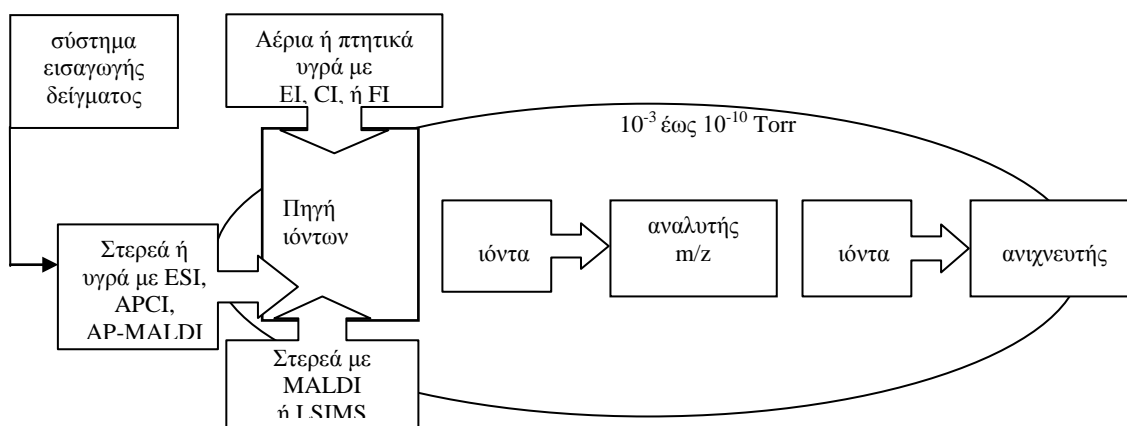
Πρόσφατα, εφαρμόστηκαν στο φασματογράφο μάζας τεχνικές βελτιώσεις για την καλύτερη διαχωριστική ικανότητα. Έτσι προέκυψαν οι ακόλουθοι τύποι φασματογράφων :

- Φασματογράφοι διπλής εστίασης
- Φασματόμετρο χρόνου – πτήσης
- Φασματόμετρο μαζών-κυκλοτρονιακού συντονισμού ιόντων
- Τετραπολικό φασματόμετρο μαζών

Στην τεχνική τετραπολικού φασματομέτρου μαζών τα ιόντα κινούνται μεταξύ τεσσάρων κυλινδρικών ηλεκτροδίων που τροφοδοτούνται διαγωνίως με εναλλασσόμενη τάση και συνεχή τάση. Με τον τρόπο αυτό τα παραγόμενα ιόντα κινούνται στο κέντρο και κατά μήκος των 4 κυλίνδρων, μεταβάλλοντας τα δυναμικά του εναλλασσόμενου και συνεχούς ρεύματος και ακολούθως φτάνουν στον ανιχνευτή. Τα νέα φασματόμετρα μαζών δίδυμης ή συζευγμένης ή σε σειρά φασματομέτρων, GC-MS-MS, έχουν επιφέρει σημαντική ακρίβεια των μετρήσεων δειγμάτων με χαμηλές συγκεντρώσεις (ρύπανση από υπολείμματα φαρμάκων, κλπ) (Βαλαβανίδης, 2006).



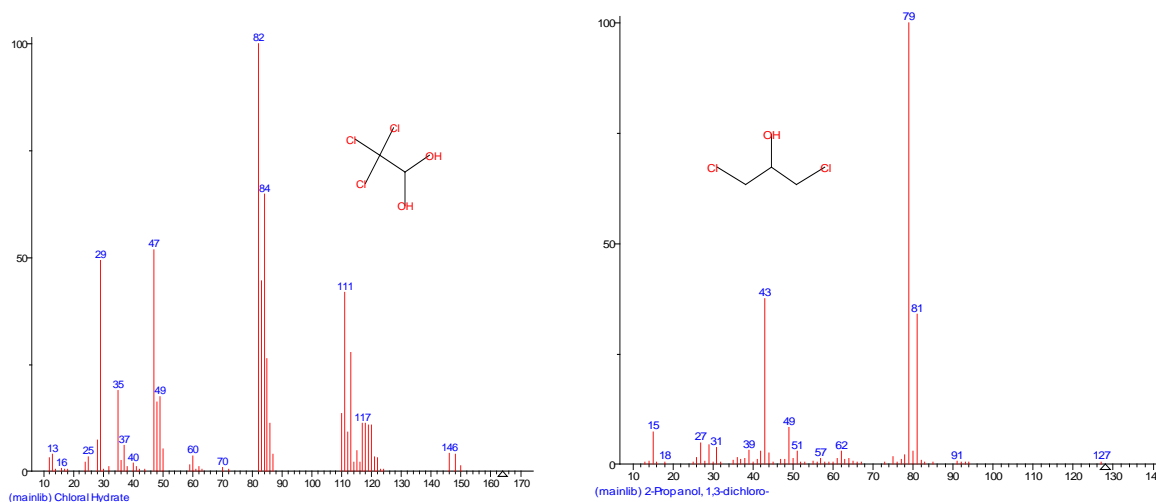
Σχήμα 15: Σχηματικό διάγραμμα τετραπολικού μαγνητικού αναλυτή (Βαλαβανίδης, 2006)



Σχήμα 16: Πηγές ιόντων [Μπακέας, 2008, (Αεριοχρωματογραφία)]

1.8.5 ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ

Στην MS παίρνουμε το φάσμα μαζών το οποίο είναι ένα σύνολο από γραμμές με διάφορα ύψη. Το φάσμα μαζών μιας ένωσης παριστάνεται συνήθως ως γράφημα, με τη μάζα (τιμές m/z) στον άξονα των τιμών χ και την ένταση στον άξονα των τιμών ψ (απόκριση συσκευής ανάλογη του αριθμού ιόντων δεδομένης τιμής m/z που φθάνουν στον ανιχνευτή). Ο λόγος μάζα/φορτίο (m/z) λαμβάνεται με διαίρεση της ατομικής ή μοριακής μάζας ενός ιόντος (m) με τον αριθμό (z) των φορτίων που φέρει. Στην υψηλότερη κορυφή, που αποκαλείται βασική κορυφή, αποδίδεται αυθαίρετα ένταση 100% (McMurry, 1998). Το πιο άφθονο ιόν χαρακτηρίζεται ως βασική γραμμή του φάσματος, κατά συνέπεια έχει σχετική αφθονία 100% και οι άλλες γραμμές λαμβάνουν ανάλογες τιμές που φαίνονται από το ύψος τους. Οι πιο πολλές από τις φασματικές γραμμές έχουν ικανοποιητικό ύψος ώστε να μπορούν να διακριθούν και με το μάτι, άλλες όμως είναι πολύ μικρές και για αυτό καταγράφονται με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού υπολογιστή (Βαλαβανίδης, 2006). Ο προσδιορισμός της σχετικής μοριακής μάζας από το φάσμα μαζών μιας ένωσης αποκτά ανεκτίμητη αξία. Για παράδειγμα, αν δοθούν τρεις όμοιες φιάλες χωρίς ετικέτα που περιέχουν η μια εξάνιο ($M_r = 86$), η δεύτερη 1-εξένιο ($M_r = 84$) και η τρίτη 1-εξίνιο ($M_r = 82$), με τη φασματομετρία μαζών είναι εφικτή η εύκολη διάκρισή τους (McMurry, 1998).



Φάσμα: Φάσμα μαζών του CH και της 1,3-DCP (NIST WebBook)

1.8.6 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΜΑΖΩΝ

Για την ερμηνεία φασμάτων απαιτείται συστηματική επεξεργασία των στοιχείων και προσεκτική εκτίμηση των μοριακών βαρών των θραυσμάτων (τμηματικών ιόντων) και ιδιαίτερα του αρχικού μοριακού ιόντος M^+ (λόγω σημαντικών παρανοήσεων που μπορεί να

δημιουργηθούν κατά την «ανάγνωση» του φάσματος). Ο ερευνητής πρέπει να λάβει υπόψη του τη μέθοδο σύνθεσης της ένωσης, τις φυσικές σταθερές της και τις άλλες φασματοσκοπικές μεθόδους (IR, UV, NMR, κλπ) σε ότι αφορά τη δομή της. Η σειρά με την οποία αποτιμάται ένα φάσμα μαζών είναι:

- Εκτιμάται το m/z για το M^+ . Πολλές φορές η φασματική γραμμή είναι πολύ ασθενής ή περιβάλλεται από πολλές (προσμίξεις κ.λπ.). Εάν ο αριθμός m/z για το M^+ είναι άρτιος, τότε υπάρχει άζωτο ή ο αριθμός των ατόμων αζώτου στο μόριο είναι άρτιος. Αντίθετα, με περιττό αριθμό του M^+ η ένωση περιέχει περιττό αριθμό ατόμων αζώτου.
- Γίνεται εκτίμηση των φασματικών γραμμών για την παρουσία διπλού δεσμού και αρωματικού δακτυλίου, συγκρίνοντας την ένταση της γραμμής για το M^+ σε σχέση με το υπόλοιπο φάσμα.
- Καταγράφονται με τη σειρά οι κυριότερες φασματικές γραμμές (αυτό γίνεται από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή του οργάνου) και σημειώνονται τα τμηματικά ιόντα με άρτιο και περιττό αριθμό m/z . Οι τιμές για ιόντα με περιττό αριθμό ηλεκτρονίων αντιπροσωπεύουν ανακατατάξεις ή απώλεια ιόντος και έχουν μεγάλη δομική σημασία.
- Καταγράφονται οι διαφορές των τιμών m/z μεταξύ M^+ και των τμηματικών ιόντων με σκοπό τον προσδιορισμό ουδέτερων μορίων (π.χ. H_2O , HCN , HX , CO , CO_2 , κ.λπ.).
- Προτείνονται δομές για τα πιο άφθονα ιόντα και συγκεντρώνονται τα διάφορα τμηματικά ιόντα σε συνδυασμούς που μπορεί να αφορούν πιθανές μοριακές δομές της ένωσης.
- Επιβεβαιώνεται, εφόσον είναι δυνατό, το φάσμα του δείγματος με ουσία της ίδιας ή παραπλήσια δομής.

1.8.7 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΤΥΠΩΝ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ΜΑΖΩΝ

Η MS θα ήταν χρήσιμη, ακόμη κι αν οι μόνες πληροφορίες που μας έδινε ήταν η σχετική μοριακή μάζα και ο μοριακός τύπος. Το φάσμα μαζών μιας ένωσης λειτουργεί σαν ένα είδος «δακτυλικού αποτυπώματος». Κάθε οργανικό μόριο θραυσματοποιείται με έναν και μοναδικό τρόπο, που εξαρτάται από τη δομή του, έτσι ώστε η πιθανότητα δυο ενώσεις να έχουν πανομοιότυπα φάσματα μαζών να είναι μικρή. Είναι δυνατό, ορισμένες φορές, να αναγνωριστεί κάποια άγνωστη ένωση, αντιπαραβάλλοντας μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή το φάσμα μαζών της με κάποιο από τα περίπου 220.000 φάσματα μαζών που έχουν καταγραφεί σε βάσεις δεδομένων (McMurry, 1998). Η θραυσματοποίηση πραγματοποιείται όταν μια κατιονική ρίζα υψηλής ενέργειας αποσυντίθεται, με την αυθόρμητη σχάση ενός χημικού δεσμού. Το ένα από τα δυο θραύσματα διατηρεί το θετικό φορτίο (είναι ένα

καρβοκατιόν), ενώ το άλλο αποτελεί μια ουδέτερη ρίζα. Το θετικό φορτίο παραμένει σε εκείνο το θραύσμα που μπορεί να το σταθεροποιήσει καλύτερα. Κατά τη θραυσματοποίηση σχηματίζεται συχνά το σταθερότερο καρβοκατιόν (Σχήμα 12, EE^+ και OE^+).

1.8.8 ΜΕΘΟΔΟΙ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ

Υπάρχουν πολυάριθμες μέθοδοι ιοντισμού στο φασματογράφο μάζας αλλά οι κύριες τεχνικές EI, CI χρησιμοποιούνται στις αναλύσεις με τη GC-MS. Ενδεικτικά αναφέρεται η τεχνική χημικού ιοντισμού αρνητικού ιόντος.

EI: Θεωρείται η πιο γνωστή μέθοδος ιοντισμού. Το εκλουστικό μέσο εισάγεται από τον αέριο χρωματογράφο σε μια μερικώς εγκλεισμένη πηγή ιόντος. Τα ηλεκτρόνια που απελευθερώνονται από ένα θερμό σύρμα ή από τη λυχνία επιταχύνονται, τυπικά, στα 70V (και για αυτό έχουν ενέργεια 70eV) πριν εισαχθούν στην πηγή ιόντος διαμέσου μιας οπής. Όταν αυτά τα ηλεκτρόνια περάσουν κοντά από τα ουδέτερα μόρια, ενδέχεται, να μεταδώσουν αρκετή ενέργεια ώστε να διεγείρουν την εξωτερική στιβάδα ηλεκτρονίων, παράγοντας πρόσθετα ελεύθερα ηλεκτρόνια και θετικά μοριακά ιόντα. Η ενέργεια που μεταδίδεται με αυτό τον τρόπο είναι υψηλή και μόνο σε σπάνιες εξαιρέσεις προκαλεί τη σχάση μέρους ή όλων των μοριακών ιόντων σε ουδέτερα άτομα και θραύσματα. Αυτή η τεχνική ιοντισμού παράγει σχεδόν αποκλειστικά θετικά φορτισμένα ιόντα (Kitson *et al.*, 1996).



Αντιδράσεις: Παραγωγή θραυσμάτων με την τεχνική ηλεκτρονικού ιοντισμού EI (Kitson *et al.*, 1996)

1.8.9 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

SIM: Η εκλεκτική παρακολούθηση ιόντων, SIM, είναι μια τεχνική συλλογής δεδομένων κατά την οποία επιλέγονται και παρακολουθούνται μόνο ορισμένα θραύσματα. Οι τιμές των θραυσμάτων είναι χαρακτηριστικές της προσδιοριζόμενης ένωσης. Οι μάζες προκαθορίζονται και προστίθενται στο πρόγραμμα της MS και πριν από την ανάλυση των δειγμάτων αφού αναζητηθούν από μια αξιόπιστη βάση δεδομένων οι τιμές των θραυσμάτων

της προσδιοριζόμενης ουσίας. Κατά συνέπεια, η SIM αποτελεί έναν γρήγορο τρόπο διερεύνησης μιας ουσίας, και εξοικονομείται ο χρόνος που απαιτεί η σάρωση σε ολόκληρο το εύρος μαζών. Η μέθοδος SIM επιτρέπει την ποσοτική ανάλυση σε επίπεδα ppb. Σε ένα σύγχρονο όργανο, το σύστημα δεδομένων μπορεί να προγραμματιστεί ώστε να εξετάσει διαφορετικά ιόντα σε πολλαπλούς χρόνους συγκράτησης. Με την εν λόγω μέθοδο επιτυγχάνεται βέλτιστη ευαισθησία και υψηλή εξειδίκευση.

Ένα τυπικό παράδειγμα εφαρμογής της SIM αποτελεί ο προσδιορισμός κάποιων συγκεκριμένων ενώσεων σε ένα μίγμα ενώσεων συναρμογής, ιδιαίτερα όταν οι ενώσεις εμφανίζονται σε χαμηλά επίπεδα. Παρόλο που η SIM είναι ευαίσθητη σε επίπεδα pg του υλικού, ωστόσο, η ευαισθησία της εξαρτάται από τη μήτρα μέσα στην οποία βρίσκονται οι ενώσεις που ενδιαφέρουν και οι παρεμποδίσεις που παράγονται. Συχνά, η ιχνοανάλυση φτάνει τα επίπεδα των pg λόγω των χημικών παρεμποδίσεων. Ο λόγος είναι ότι τα παρεμποδίζοντα ιόντα βρίσκονται εντός του επιλεγμένου παραθύρου SIM για το προσδιοριζόμενο συστατικό στο πείραμα και οι παρεμποδίσεις δεν μπορούν να αρθούν ακόμη κι αν προστεθούν εσωτερικά πρότυπα. Εάν είναι διαθέσιμη η κατάλληλη οργανολογία, είναι δυνατό να ελαττωθεί ή να περιοριστεί το υπόβαθρο παρεμποδίσεων αυξάνοντας τη διακριτική ικανότητα του οργάνου ώστε να συρρικνώνεται το παράθυρο της μάζας. Μια εναλλακτική οδός που περιορίζει το υπόβαθρο των παρεμποδίσεων είναι η χρήση συζευγμένης τεχνικής MS/MS με επιλογή SIM, για να παρακολουθεί τα χαρακτηριστικά θραύσματα (Kitson *et al.*, 1996).

SCAN: Αποτελεί την τεχνική συλλογής δεδομένων των μαζών σε μια γνωστή και εκτεταμένη περιοχή θραυσμάτων και αποτελεί έναν αργό τρόπο διερεύνησης μιας ουσίας.

1.9 ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΤΕΧΝΙΚΗ GC - MS

1.9.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάγκη για ακρίβεια στις μετρήσεις και για διερεύνηση των χημικών ουσιών σε χαμηλά επίπεδα (ppm, ppb, ppt) ώθησε τους ερευνητές προς αναζήτηση νέων τεχνικών με συνδυασμό δυο ή και περισσότερων επιμέρους οργάνων. Ο σχεδιασμός ενός συστήματος που συνδέει δυο όργανα που λειτουργούν σε ακραίες συνθήκες πίεσης θεωρείται μια καινοτόμα τεχνική. Η συνδυασμένη τεχνική GC-MS ήταν από τις πρώτες που συνδέθηκαν με την αέρια χρωματογραφία από τον Gohlke, το 1959. Ο ρόλος της είναι διττός. Αυτό σημαίνει ότι ο MS μπορεί να αποτελέσει ανιχνευτή στην αέρια χρωματογραφία, αλλά και ο αέριος χρωματογράφος να είναι το σύστημα κατεργασίας-εισαγωγής του δείγματος για το

φασματογράφο μαζών. Η GC-MS παρέχει το σημαντικό πλεονέκτημα επιβεβαίωσης στην ταυτοποίηση των χρωματογραφικών κορυφών με σύγκριση του φάσματος μάζας που αντιστοιχεί σε κάθε κορυφή με τα φάσματα πρότυπων ουσιών που είναι αποθηκευμένα στη βιβλιοθήκη βάσης δεδομένων του οργάνου.

Η συνδυασμένη τεχνική GC-MS αξιοποιεί τα πλεονεκτήματα των δυο μεμονωμένων τεχνικών, δηλαδή τη δυνατότητα άριστου διαχωρισμού και ποσοτικού προσδιορισμού που παρέχει ο GC και τη δυνατότητα ταυτοποίησης που παρέχει το MS. Ένα πρόβλημα ασυμβατότητας είναι η διαφορά στην πίεση που απαιτείται για τη λειτουργία του GC και του MS. Το πρώτο λειτουργεί σε υψηλή πίεση ενώ το MS είναι σχεδιασμένο να λειτουργεί σε υψηλό κενό (Παπαδογιάννης, 2001).

1.9.2 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Είσοδος δείγματος: επιτρέπει την εισαγωγή μιας μικροποσότητας του εκάστοτε δείγματος. Τα αέρια δείγματα εισάγονται μέσα στην πηγή ιοντισμού διαμέσου μιας μικρής οπής. Για τα υγρά ή τα διαλύματα στερεών δειγμάτων υπάρχει η είσοδος που φέρει διάφραγμα.

Πηγές ιοντισμού: η τεχνική του ιοντισμού μορίου που συγκρούεται με ηλεκτρόνιο, EI, αποτελεί την παλαιότερη, απλούστερη και πιο κοινή τεχνική. Η πηγή ιοντισμού θερμαίνεται και υπό κενό τα περισσότερα δείγματα εξατμίζονται ήπια και κατόπιν ιοντίζονται.

Αναλυτές και ανιχνευτές: μετά τον ιοντισμό, τα φορτισμένα θραύσματα απωθούνται και έλκονται από φορτισμένους φακούς μέσα στον αναλυτή μάζας. Εκεί τα ιοντικά είδη διαχωρίζονται βάσει του λόγου μάζας/φορτίο (m/z) είτε από μαγνητικά είτε από ηλεκτρικά πεδία. Τυπικοί αναλυτές μάζας για τη GC-MS είναι τα δίπολα και η παγίδα ιόντος. Η απλότητα, το μικρό μέγεθος, το μέτριο κόστος και η γρήγορη σάρωση κάνουν τον αναλυτή διπόλου ιδανικό για τα συστήματα GC-MS. Εν τούτοις, περιορίζεται σε περίπου 2,000 Daltons. Οι παγίδες ιόντος είναι απλοί στο σχεδιασμό, μέτριοι σε κόστος και επιτυγχάνουν γρήγορη σάρωση στις εφαρμογές GC-MS. Στον αναλυτή παγίδας ιόντος το καταγεγραμμένο φάσμα διαφέρει από το φάσμα του αναλυτή διπόλου. Ακόμη, ορισμένα ιόντα ενδέχεται να υποστούν διάσπαση ή σύγκρουση ιόντος/μορίου εντός του αναλυτή παγίδας ιόντος.

Τα δυο συστήματα είναι συμβατά μεταξύ τους και για το λόγο αυτό είναι εφικτή η σύζευξή τους. Οι συνθήκες που επικρατούν και στα δυο συστήματα είναι πανομοιότητες.

Δηλαδή λειτουργούν θερμαινόμενα (200-300 °C), είναι κατάλληλα για ουσίες στην αέρια κατάσταση και απαιτούν μικρές ποσότητες δείγματος (μg ή ng). Το μόνο πρόβλημα είναι ότι η ατμοσφαιρική πίεση στην έξοδο του GC πρέπει να μειωθεί σε κενό στους 10^{-5} με 10^{-7} Torr για την είσοδο του MS. Η σύζευξη των δυο πρέπει να στοχεύει σε μείωση της πίεσης και επιτυγχάνεται με μια διεπιφάνεια.

Το πιο σημαντικό πρόβλημα στην MS ήταν μέχρι πρόσφατα η καθαρότητα του δείγματος. Ακόμη και ελάχιστες ποσότητες προσμίξεων ή παράγωγα της ένωσης μπορούν να δώσουν πολλές ανεξήγητες φασματικές γραμμές που θα δυσκολέψουν την ερμηνεία του φάσματος. Εάν όμως το δείγμα περάσει μέσα από τη στήλη διαχωρισμού ενός αέριου χρωματογράφου τότε παραλαμβάνεται σε τελείως καθαρή κατάσταση. Οι ποσότητες (10^{-12} μέχρι 10^{-3} g) που εξέρχονται μετά τη χρωματογράφιση είναι στην αέρια φάση και σε ιδανικές συνθήκες για να περάσουν στο θάλαμο ιοντισμού του MS, με την προϋπόθεση να απομακρυνθεί το φέρον αέριο (συνήθως He). Η απομάκρυνση του φέροντος αερίου γίνεται με φίλτρα (από συντηγμένο γυαλί) ή με μεμβράνες, ενώ η πιο συνηθισμένη μέθοδος είναι με την επίδραση του κενού (Βαλαβανίδης, 2006).

Το φέρον αέριο και το κλάσμα της οργανικής ένωσης διαβιβάζονται, μετά το διαχωρισμό τους από τον GC, σε ένα ακροφύσιο διαχωρισμού (jet separator). Με τον τρόπο αυτό η οργανική ένωση (σε αέρια κατάσταση), που είναι πιο βαριά από το He, περνάει στο σύνολό της κατά μήκος του υψηλού κενού (μεταξύ των δύο ακροφύσιων) στο θάλαμο ιοντισμού, ενώ το μικρού μοριακού βάρους αέριο διαχέεται πλαγίως, κάτω από την επίδραση του κενού (Βαλαβανίδης, 2006). Ο GC είναι άμεσα συνδεδεμένος με τον MS και το φάσμα μαζών κάθε μιας ουσίας στο μίγμα καταγράφεται καθώς εγκαταλείπει τη στήλη διαχωρισμού. Με τον τρόπο αυτό, που υποβοηθείται σε σημαντικό βαθμό τελευταία με ηλεκτρονική καταγραφή του χρωματογραφήματος και ευχέρεια ακριβούς διαχωρισμού, γίνεται και η ανίχνευση μικρών ποσοτήτων προσμίξεων και η πιστοποίησή τους (Βαλαβανίδης, 2006).

Παρά τους περιορισμούς και τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει ο συνδυασμός GC-MS (απαιτείται ταχύτατη καταγραφή του φάσματος, ορισμένες αντιδράσεις ισομερισμού μέσα στη στήλη διαχωρισμού του αέριου χρωματογράφου περνούν απαρατήρητες, μικρές ποσότητες του φέροντος αερίου διαφεύγουν στο θάλαμο ιοντισμού, κλπ) (Βαλαβανίδης, 2006). Η ανάγνωση του φάσματος και η σύγκριση του με φάσματα από μια συλλογή 30000-40000 φασμάτων σε τράπεζα πληροφοριών είναι πλέον εργασία απλή με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού υπολογιστή που φέρουν όλοι οι νέοι φασματογράφοι μάζας (Βαλαβανίδης, 2006).



Σχήμα 17: Σύζευξη αέριου χρωματογράφου με φασματογράφο μάζας (McNair, 1998)

1.9.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ GC - MS

Ως αναλυτική μέθοδος, η GC-MS εφαρμόζεται με μεγάλη επιτυχία στην ανάλυση (ρουτίνας πλέον) βιολογικών υγρών (φάρμακα, στεροειδή και μεταβολίτες στο αίμα και τα ούρα), περιβαλλοντικών δειγμάτων (φυτοφάρμακα), τρόφιμα (τοξικές ουσίες), στο πόσιμο νερό (τοξικές ουσίες), προϊόντα προσωπικής περιποίησης κλπ.

1.9.3.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ

Σε αναλύσεις ρουτίνας βιολογικών δειγμάτων, η μέθοδος GC-MS αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς στην ανίχνευση στεροειδών ορμονών φαρμακοδιέγερσης (doping) όπως και στον προσδιορισμό τεστοστερόνης από κατάχρηση σε δείγματα πλάσματος αίματος αθλητών (Wolthers *et al.*, 1999). Η ανίχνευση με GC-MS της ύπαρξης ανώμαλων δομών οργανικών οξέων σε βιολογικά υγρά, ειδικά στα ούρα, αποτελεί το κύριο βήμα που οδηγεί στη διάγνωση διαταραχών που προκαλεί η οργανική οξυουρία (Wajner *et al.*, 2009).

1.9.3.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Η GC-MS έχει ευρεία εφαρμογή στην επιβεβαίωση της χημικής ένωσης δισφαινόλη Α στην ανάλυση τροφίμων χωρίς την ανάγκη για παραγωγοποίηση (Ballesteros-Gomez *et al.*, 2009). Ένα από τα άπειρα παραδείγματα εφαρμογής της GC-MS είναι ο διαχωρισμός και πιστοποίηση των εκατοντάδων οργανικών ενώσεων που περιέχονται στο άρωμα του καφέ. Η έκθεση μιας ακόμη έρευνας αναφέρει την επιτυχή εφαρμογή της GC-MS στην ανάλυση των PAHs σε εκχύλισμα που προήλθε από το χαρμάνι του καφέ (Orecchio *et al.*, 2009).

Η τεχνική GC-MS αποτελεί την επίσημη τεχνική για τον προσδιορισμό της 3-MCPD και 1,3 DCP σε τρόφιμα όπως και για την ανίχνευση της τοξικής ένωσης ακρυλαμίδιο (Γενικό Χημείο του Κράτους). Με τη GC-MS επιτράπηκε η ταυτόχρονη ανάλυση τεσσάρων

χλωροπροπανολών σε σάλτσα σόγιας. Πιο συγκεκριμένα, αναλύθηκαν οι χλωροπροπανόλες: 1,3-DCP, 2,3-DCP, 3-MCPD, και 2-MCPD (Xu *et al.*, 2006). Με τροποποίηση μιας μεθόδου GC-MS για τον προσδιορισμό της 3-MCPD, μελετήθηκε ο προσδιορισμός της 1,3-DCP σε σόγια και παρόμοιες σάλτσες (Nyman *et al.*, 2003).

1.9.3.3 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Σε ευρεία κλίμακα, η σύγχρονη και ευαίσθητη τεχνική GC-MS χρησιμοποιείται στην ανάλυση αφενός των φυτοφαρμάκων και αφετέρου των μεταβολιτών ενώσεων τους σε περιβαλλοντικά δείγματα. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι για τον έλεγχο ως προς τη συμμόρφωση με κοινοτική οδηγία, υποβλήθηκαν σε ανάλυση με την τεχνική GC-MS δείγματα επιφανειακού νερού (Lerom *et al.*, 2009). Αρκετά είναι τα άρθρα που προσάρμοσαν στις αναλυτικές τους ανάγκες τη συνδυασμένη τεχνική της GC-MS αποσκοπώντας στον προσδιορισμό ενώσεων σε δείγματα εδαφών (Duran-Alvarez *et al.*, 2009). Στα πλαίσια προσδιορισμού του ζιζανιοκτόνου 2,6-διχλωροβενζονιτρίλιο και των κύριων μεταβολιτών του 2,6-διχλωροβενζαμιδίου και 2,6-διχλωροβενζοϊκού οξέος σε δείγματα υπογείου νερού, αναπτύχθηκε η μέθοδος με GC-MS (Porazzi *et al.*, 2005). Τα όρια ανίχνευσης των PAHs με GC-MS μπορούν να κατέβουν στην τάξη του pg (Κουϊμτζής, 2001). Δεδομένου του ότι η GC, συχνά, είναι ανεπαρκής για την ανάλυση των PAHs εξαιτίας της θερμικής αστάθειας ορισμένων μελών αυτής της κατηγορίας και της χαμηλής πτητικότητας των μελών υψηλού μοριακού βάρους προτείνεται η HPLC στην ανάλυση των εν λόγω ενώσεων (Κουϊμτζής, 2001).

1.9.3.4 ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΡΟΣΩΠΙΚΗΣ ΠΕΡΙΠΟΙΗΣΗΣ

Το άρθρο μιας πρόσφατης έρευνας αναφέρει ότι η GC-MS χρησιμοποιήθηκε ακόμη και στην ανάλυση συστατικών που περιέχονταν σε αρώματα, όπως είναι οι αντιμικροβιακές ενώσεις (π.χ. triclosan), αναστολείς υπερϊώδους ακτινοβολίας, αντιοξειδωτικά, συντηρητικά, εντομοαπωθητικά (Pietrogrande *et al.*, 2007).

ΣΚΟΠΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο:

- Την ανασκόπηση των μεθόδων της βιβλιογραφίας αναφορικά με τον προσδιορισμό των ουσιών CH και 1,3-DCP στο πόσιμο νερό.
- Την ανάπτυξη μεθόδου ταυτόχρονου προσδιορισμού για τις ουσίες.
- Βελτισποίηση για την ανάπτυξη μιας γρήγορης και ευαίσθητης μεθόδου.
- Την εύρεση των ορίων ανίχνευσης (LOD, LOQ) της GC-MS.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

2.1.1 ΚΥΡΙΟΣ

Αέριος Χρωματογράφος: 7890 A, Agilent Technologies, GC System

Ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών: 5975 C, Agilent Technologies, inert XL MSD

Στήλη: HP-VOC: 60m x 320 μm x 1.8 μm, 545.71552

Αυτόματος δειγματολήπτης: 7683 B Series, Agilent Technologies

Σύριγγα εισαγωγής δείγματος: Agilent gold standard Syringe, Part 5181-1267, 10μL
ΦN 23-26/42/HP

Συσκευή φυγοκέντρησης: Eppendorf, Centrifuge 5810

Φέρον αέριο: Ήλιο ποιότητας ECD, καθαρότητας 99,999%, Προσμίξεις (ppm): O₂ ≤ 2 ppm, THC ≤ 0,1 ppm, HC ≤ 1 ppb, H₂O ≤ 2 ppm

2.1.2 ΒΟΗΘΗΤΙΚΟΣ

- Ζυγοί Ακριβείας: Kern 770 d=0,0001 gr (για τις πρότυπες ουσίες), AND Electronic Balance FX-3200 (για τα άλατα)
- Μικροσύριγγα εταιρίας Hamilton 701 N ga 265/51mm/ pst 2/, 10μL PIN : 80300/00, WO: 1315378, 27/07 (παρασκευή του πατρικού διαλύματος της 1,3-DCP)
- Επαναληπτικό σιφώνιο εταιρίας Socorex, 0,2-2ml, Calibra, Autoclavable 832.
- Επαναληπτικά σιφώνια, Gilson, Microman, 3-25 (M25), 20-50 (M50), 50-250 (M250), 100-1000 (M1000) μL
- Σκουρόχρωμα φιαλίδια χωρητικότητας 40 ml (amber vials)
- φιαλίδια GC-MS (και τα δυο είδη)
 1. εταιρίας national scientific, macrovial target, snap-it clear, C4011-LV1
 2. εταιρίας Chromacol, vial 12x32 micro + w/0.9μL, insert clr 11mm
- ογκομετρικές φιάλες χωρητικότητας 100ml και 10ml για παρασκευή προτύπων
- Pipettes Pasteur ISOLAB, Germany GmbH, length ~ 150mm, 108.03.001, (θέρμανση στους 450 °C για 12 ώρες) για το επαναληπτικό σιφώνιο Socorex.
- Σύριγγες εμπορίου, χωρητικότητας 1,5 και 2,5 ml.

2.1.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Πίνακας 5: Οι ουσίες και τα χαρακτηριστικά τους

ΟΥΣΙΑ	ΕΤΑΙΡΙΑ	ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ
1,3 DCP υγρή μορφή	Ehrenstorfer GmbH	Καθαρότητα: 99,5% C 11098000 Lot: 30716 Detection: GC-MSD
CH στερεή μορφή	Ehrenstorfer GmbH	Καθαρότητα: 99,5% C 12481600 Lot: 61017 Detection: GC-MSD

Πίνακας 6: Το νερό και τα χαρακτηριστικά του

Νερό	Εταιρία	Προδιαγραφές	Χρήση
Milli-RO 5 plus	Millipore	Water purification system	Ξέπλυμα με απορρυπαντικό 1 ^ο ξέπλυμα σκευών
Milli-Q plus 185	Millipore	Ultra pure water system	Αραιώσεις δειγμάτων 2 ^ο ξέπλυμα σκευών

Πίνακας 7: Τα αντιδραστήρια και τα χαρακτηριστικά τους

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΕΤΑΙΡΙΑ	ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ	ΧΡΗΣΕΙΣ
Μεθανόλη	Panreac (PAR) PAI 321091.1612	Assay 99,9%	Διαλύτης έκπλυσης μικροσύριγγας GC Διαλύτης συντήρησης προσδιοριζόμενων ουσιών στα stock solutions
Εξάνιο κανονικό	Lab-scan	Analytical reagent assay 95%	1 ^{ος} διαλύτης έκπλυσης γυάλινων σκευών
Ακετόνη	Lab-scan	Grade Analytical Reagent assay 99,5% A01C11X 02 58/8	2 ^{ος} διαλύτης έκπλυσης γυάλινων σκευών μετά την έκπλυση με εξάνιο
Οξικός Αιθυλεστέρας	Fisher Scientific	Analytical reagent grade assay 99,97% Code: E/0900/17 Batch: 0761750	Διαλύτης εκχύλισης δειγμάτων
MTBE	Lab-scan	HPLC Assay: 99,8% C 39 C 11 X 1550/7	Διαλύτης εκχύλισης δειγμάτων
DCM	Acros Organics	For analysis assay 99,99% Code: 113460025 Lot: 0620737	Διαλύτης εκχύλισης δειγμάτων Διαλύτης έκπλυσης γυάλινων σκευών
Na ₂ SO ₄ (θειικό νάτριο άνυδρο)	Reag USP	Assay min. 99,0% 131716.1211	Στερεή ουσία που αυξάνει την ιοντική ισχύ του διαλύματος. Καλύτερος διαχωρισμός υδατικής/οργανικής στιβάδας
(NH ₄) ₂ SO ₄ (θειικό αμμώνιο)	Merck	Pro analysi assay min. 99,5% 1217.1000 008 A479417	Στερεή ουσία που αυξάνει την ιονική ισχύ του διαλύματος, καλύτερος διαχωρισμός υδατικής/οργανικής στιβάδας

2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ

2.2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Οι δοκιμές σε πειραματική διάταξη έγιναν βάσει των ακολούθων κριτηρίων: Η μέθοδος αναπτύχθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο 551,1 της EPA για τον CH και την 1,3-DCP (EPA, 1998). Η μέθοδος EPA 551,1 έχει σημαντικές βελτιώσεις σε σχέση με την EPA 551. Μια σημαντική βελτίωση αποτελεί η χρήση Na_2SO_4 αντί του NaCl για την εκχύλιση των DBPs με MTBE. Η μεταβολή προέκυψε από την ανάγκη για καλύτερες ανακτήσεις ορισμένων βρωμιωμένων DBPs εξαιτίας προσμίξεων στη σύσταση του NaCl (Xie, 1995; EPA, 1998).

Η διεξαγωγή πειραμάτων αποσκοπεί στην επιλογή μιας κατάλληλης μεθόδου που να δύναται να εφαρμοστεί σε δείγματα πόσιμου νερού, επιτρέποντας την παράλληλη ανάλυση των δυο ουσιών, του CH και της 1,3-DCP. Για την επίτευξη του στόχου είναι απαραίτητη η διεξαγωγή μιας ακολουθίας πειραμάτων που να στηρίζονται σε δοκιμές τόσο στην πειραματική διαδικασία όσο και στην επιλογή των συνθηκών του οργάνου.

- εύρεση κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης για τα δείγματα
- επιλογή κατάλληλου άλατος, μεταξύ του Na_2SO_4 και $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, για την κατεργασία των δειγμάτων
- ελάττωση της ποσότητας του άλατος
- επίτευξη του βέλτιστου διαχωρισμού υδατικής/οργανικής στιβάδας και απομάκρυνσης του στερεού από την οργανική στιβάδα (ρύθμιση ταχύτητας και χρόνου φυγοκέντρησης)
- ελάττωση όγκου διαλύτη εκχύλισης υγρού-υγρού, LLE

Οι δοκιμές σε επίπεδο συνθηκών του οργάνου βασίστηκαν στις παραμέτρους:

- Θερμοκρασιακό πρόγραμμα φούρνου για τη στήλη της GC
- Τρόπος εισαγωγής ουσιών pulsed injection, (για μεγάλο όγκο δείγματος), splitless injection
- Solvent delay καθυστέρηση ανάλυσης ουσιών έως ότου εξατμιστεί ο διαλύτης
- Τρόπος αναζήτησης θραυσμάτων ουσίας SIM ή SCAN

2.2.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η παρουσία και άλλων συστατικών, πλέον του προσδιοριζόμενου, πολλές φορές δημιουργούν σοβαρά προβλήματα στην ανίχνευσή του, λόγω κοινών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών αυτών με το προσδιοριζόμενο συστατικό. Προφανώς η ευκολότερη λύση στο πρόβλημα αυτό είναι η χρησιμοποίηση αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού μόνο του συγκεκριμένου συστατικού κι όχι των υπολοίπων τα οποία συνυπάρχουν. Εντούτοις, στην παρούσα εργασία επιδίωξη ήταν να προστεθούν οι δυο ουσίες, CH και 1,3-DCP, σε κοινό διάλυμα και με αυτό τον τρόπο να παρασκευαστούν τα πρότυπα διαλύματα και η αντίστοιχη καμπύλη βαθμονόμησης τους. Η αρχική επιδίωξη ήταν οι δυο ενώσεις να αναλύονται με μια μέθοδο που θα επιτρέπει την παράλληλη ανίχνευσή τους χωρίς η παρουσία της μιας να παρεμποδίζει τον προσδιορισμό της δεύτερης. Οι ουσίες ταυτοποιήθηκαν με σύγκριση των φασμάτων μαζών με τα πρότυπα φάσματα της ηλεκτρονικής βιβλιοθήκης της NIST (MS Search 2.0). Η ανάπτυξη μεθόδου πλαισιώνεται από όλα τα στάδια μιας πειραματικής διάταξης που περιλαμβάνει την κατάρτιση του εργαστηριακού εξοπλισμού, προετοιμασία των διαλυμάτων και επιλογή των ρυθμίσεων του οργάνου GC-MS.

Η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας οδήγησε στην εύρεση εργασιών με αντικείμενο μελέτης την ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού του CH και της 1,3-DCP στο πόσιμο νερό. Κατά την αναζήτηση μιας μεθόδου που να μπορεί να προσαρμοστεί στις συνθήκες του εργαστηρίου, επιλέχθηκαν οι εργασίες των Nikolaou *et al.* (2005), Yan *et al.* (1999) για τον CH και Schuhmacher *et al.* (2005) για την 1,3-DCP. Τα πειράματα όσον αφορά στην παρουσία του CH στο πόσιμο νερό στηρίχθηκαν στα πειραματικά δεδομένα των Nikolaou *et al.* (2005) και Yan *et al.* (1999). Για την παρουσία της 1,3-DCP στο πόσιμο νερό δοκιμάστηκαν στο εργαστήριο τα πειραματικά δεδομένα των Schuhmacher *et al.* (2005). Εν τούτοις, οι μέθοδοι προσδιορισμού για τον CH και την 1,3-DCP διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους τόσο σε πειραματική διάταξη όσο και στις ρυθμίσεις του οργάνου. Ιδιαίτερη μέριμνα δόθηκε στην επιλογή των σταδίων της πειραματικής διάταξης και των ρυθμίσεων του οργάνου, ώστε η μέθοδος προσδιορισμού του CH να μην επηρεάσει αρνητικά την παρουσία της 1,3-DCP και το αντίστροφο. Σε αντίθεση με τον CH, που αποτελεί μια ασταθή ένωση, η 1,3-DCP είναι σχετικά σταθερή. Φαίνεται ότι οι δυο ουσίες δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους στο κοινό τους διάλυμα. Το πειραματικό μέρος των εργασιών προσαρμόστηκε στις επικρατούσες εργαστηριακές συνθήκες. Τα πυκνά διαλύματα παρακαταθήκης διαλύθηκαν σε CH₃OH, όπως αναφερόταν στις εργασίες.

2.2.3 ΡΥΘΜΙΣΕΙΣ ΟΡΓΑΝΟΥ

Αυτοέλεγχος οργάνου για τη MS

Ο αυτοέλεγχος της MS περιλαμβάνει έλεγχο του οργάνου σε τρεις διαφορετικές μάζες, 69, 219, 502. Γινόταν προτού αναλυθούν τα δείγματα καθώς και μετά την αντικατάσταση φιάλης του αερίου He. Το όργανο λειτουργούσε ορθά όταν η πρόδρομη της μάζας 69 είναι μικρότερη ή ίση 3%, για τη μάζα $219 \leq 6\%$ και για τη μάζα $502 \leq 12\%$. Η αναλογία 18/69 να είναι μικρότερη από 20% και 28/69 μικρότερη από 10%. Έλεγχος γραμμής υποβάθρου και εντοπισμός των προσμίξεων που δίνουν κορυφές στα χρωματογραφήματα έγινε με μέτρηση άδειου φιαλιδίου.

Εκπλύσεις μικροσύριγγας δειγμάτων

Η μικροσύριγγα των δειγμάτων εκπλυνόταν σε διαλύτη CH_3OH . Το φιαλίδιο της CH_3OH ήταν τοποθετημένο σε υποδοχή πάνω στον αυτόματο δειγματολήπτη. Οι εκπλύσεις ρυθμίστηκαν μέσω του λογισμικού προγράμματος του GC-MS. Σε κάθε ανάλυση πραγματοποιούσε τρεις εκπλύσεις πριν τη μεταφορά του δείγματος στο GC και τρεις φορές μετά για να ξεπλυθεί από τα υπολείμματα του δείγματος και να προετοιμαστεί για την επόμενη εισαγωγή δείγματος. Ο όγκος της CH_3OH για κάθε έκπλυση ήταν 8μL. Η μικροσύριγγα εκπλυνόταν με άντληση 2 μL από το προς ανάλυση δείγμα 5 φορές και απόχυση των μικροόγκων μέσα στο ίδιο. Κατά την έκτη άντληση γινόταν η εισαγωγή στον προθερμασμένο εισαγωγέα του GC κατευθυνόμενο προς τη στήλη. Το διάφραγμα (septum) που βρίσκεται πάνω από τον εισαγωγέα, καθώς διαπερνάται από τη μικροσύριγγα μετά τις εισαγωγές, φθείρεται και αντικαθίσταται μετά από 200 εισαγωγές.

Τεχνική συλλογής δεδομένων SIM - SCAN

Με τη SCAN τεχνική συλλογής δεδομένων η ανίχνευση της 1,3-DCP ήταν εφικτή όμως για τον CH ανέφικτη. Η επιλογή SIM των 10 ιόντων 29, 35, 47, 49, 82, 83, 84, 85, 111, 113 με τις εντονότερες εντάσεις που πρότεινε η βιβλιοθήκη της NIST κατέστησε εφικτή την εμφάνιση κορυφών του CH. Τα 10 ιόντα για την 1,3-DCP είναι τα 15, 27, 29, 31, 39, 43, 49, 51, 79, 81. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ήταν $50\text{ }^\circ\text{C}$ (1 min, $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$) \rightarrow $200\text{ }^\circ\text{C}$ (0 min) και η συγκέντρωση 10 ppb. Διαλύτης εκχύλισης ο Ε.Α. Ωστόσο η μέθοδος έπρεπε να γίνει πιο ευαίσθητη και να περιοριστεί ο χρόνος ανάλυσης ελαττώνοντας τον αριθμό των ιόντων. Για τον CH επιλέχθηκαν οι μάζες 47, 82, 84, 111 και για την 1,3-DCP οι 43, 49, 79, 81. Οι μάζες 47 (CH) και 43 (1,3-DCP) διαγράφηκαν γιατί αποτελούν κορυφές που δίνουν χαμηλές τιμές αφθονίας (abundance) και δεν επιβεβαίωναν επαρκώς τις κορυφές των προσδιοριζόμενων ουσιών. Μετά από επικάλυψη των φασμάτων μαζών της

προσδιοριζόμενης ουσίας με τα πρότυπα φάσματα της NIST φαινόταν ότι οι φασματικές γραμμές δεν ταυτίζονταν. Τα εν λόγω ιόντα αποτελούν αφενός μικρές, ανακριβείς μάζες και αφετέρου η μάζα 43 δίνει κορυφή μικρής έντασης. Ακόμη η μάζα 43 αποτελεί τη μάζα θραυσμάτων πολλών υδρογονανθράκων και ενώσεων με καρβονυλομάδες (C_3H_7 , CH_3CO) δημιουργώντας σύγχυση κατά την ταυτοποίηση της 1,3-DCP. Ο χρόνος αναζήτησης και παραμονής για κάθε ιόντος (dwell time) προσαρμοζόταν όταν μεταβαλλόταν ο αριθμός των ιόντων αλλά πάντοτε έπρεπε να μένει μικρότερος από 300 msec. Η εύρεση του χρόνου για κάθε ιόν γινόταν με διαίρεση του συνολικού χρόνου 300 msec προς το συνολικό αριθμό των ιόντων. Στο κοινό τους διάλυμα οι δυο ουσίες, CH και 1,3-DCP, ταυτοποιήθηκαν αφού πρώτα ομαδοποιήθηκαν οι μάζες της κάθε ουσίας. Ο CH άνηκε στην ομάδα 1 (group 1) και περιελάμβανε τα ιόντα 82, 84, 111, 113. Η 1,3-DCP άνηκε στην ομάδα 2 (group 2) με τα ιόντα 49, 79, 81.

Εισαγωγή δείγματος

Ο όγκος εισαγωγής δείγματος ήταν 2 μ L και παρέμεινε σταθερός. Ο τρόπος εισαγωγής δείγματος ήταν pulsed injection αρχικά. Αποτελεί ενδεδειγμένο τρόπο εισαγωγής μεγάλης ποσότητας δείγματος και προστατεύει το δείγμα από αποσύνθεση. Ωστόσο μεταβλήθηκε σε splitless injection διότι προσφέρει βελτιωμένη ευαισθησία. Η ελάττωση της ροής από 1,8 σε 1,3 ml/min συνετέλεσε στη μεταβολή του τρόπου εισαγωγής του δείγματος. Τα αποτελέσματα της εισαγωγής splitless ικανοποιούν την ιχνοανάλυση σε περιβαλλοντικά δείγματα κ.α.

Καθυστέρηση χρόνου διαχωρισμού (solvent delay)

Ο διαχωρισμός του μίγματος στα συστατικά του μέσα στη στήλη πραγματοποιείται αφού πρώτα εξατμιστεί ο διαλύτης. Στο χρωματογράφημα οι ουσίες αρχίζουν να φαίνονται μόλις εξατμιστεί ο διαλύτης. Ο διαλύτης πρέπει να έχει μικρότερο σ.ζ. κατά 30-40 $^{\circ}$ C από τις προσδιοριζόμενες ουσίες. Η καθυστέρηση του διαλύτη ρυθμίστηκε στα 7, 7,5 και 8 min. Όταν μεταβαλλόταν ο διαλύτης έπρεπε να ελεγχθεί του δείγματος μέσα από το πρόγραμμα flow calculation.

Παράγοντας ενίσχυσης (gain factor)

Αποτελεί τον παράγοντα ενίσχυσης της απόκρισης κάθε κορυφής όταν το δείγμα βρίσκεται σε πολύ μικρή συγκέντρωση (δίνει σήμα χαμηλής έντασης). Παίρνει τιμές μεταξύ 0 – 13 (2^0 - 2^{13}). Αλλαγή μιας τιμής κατά 1 είναι ισοδύναμο με αύξηση του ύψους των κορυφών του χρωματογραφήματος κατά τον παράγοντα 2. Στα πειράματα ενισχύθηκε από 1 που ήταν αρχικά σε 10, κάνοντας τις κορυφές των χαμηλών συγκεντρώσεων πιο ευδιάκριτες.

Ροή δείγματος

Η ροή δείγματος επιλέχθηκε σε ρυθμό 1,8 ml/min αλλά κατά την πειραματική πορεία ελαττώθηκε σε 1,3 ml/min.

Υπολογισμός ροής

Η ροή του δείγματος εξαρτάται από τον εκάστοτε διαλύτη. Ο υπολογισμός γίνεται με ρύθμιση της ροής εντός των προκαθορισμένων, στις προδιαγραφές του οργάνου, ρυθμίσεων. Η ρύθμιση του όγκου (μL) εξάτμισης γίνεται βάσει προγραμματισμού αφού προεπιλεγούν οι φυσικές ιδιότητες του διαλύτη (σ.ζ. πυκνότητα, σχετική μοριακή μάζα), γίνουν ρυθμίσεις όσον αφορά στον όγκο εισαγωγής δείγματος, θερμοκρασία και πίεση εισόδου, μονάδα πίεσης σε psi, επιλογή του κατάλληλου τύπου liner.

Θερμοκρασία εισαγωγέα

Η θερμοκρασία εισαγωγέα ελαττώθηκε από 280 σε 250 °C για προστασία του CH από διάσπαση πριν το διαχωρισμό.

2.2.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ CH ΚΑΙ 1,3-DCP

CH: πυκνό διάλυμα παρακαταθήκης, (stock solution)

Για την παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης CH σε CH₃OH συγκέντρωσης 1000 ppm, ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας με 4 δεκαδικά ψηφία 0.0100 g στερεής ουσίας (10 mg). Με μεταλλική σπάτουλα μεταφέρθηκαν, προσεκτικά, σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml που είχε πρωτύτερα εκπλυθεί με δυο διαλύτες, εξάνιο και ακετόνη, τρεις φορές από τον καθένα. Με έναν πλαστικό υδροβολέα προστέθηκε ο όγκος της μεθανόλης έως τη χαραγή της φιάλης και ανακινήθηκε. Η φιάλη τυλίχθηκε εξωτερικά με αλουμινόχαρτο για την αποφυγή φωτοξείδωσης και parafilm για τον αποκλεισμό οξείδωσης από τον ατμοσφαιρικό αέρα και εξάτμισής της. Από το διάλυμα των 1000 ppm παρασκευάστηκε σε ογκομετρική φιάλη (10 ml) ένα ενδιάμεσο σε συγκέντρωση 5 ppm, για αποφυγή επιμολύνσεων. Οι φιάλες συντηρήθηκαν στους 2-7 °C για όλο το χρονικό διάστημα των πειραμάτων (φύλαξη στο ψυγείο προτύπων συντήρησης και παρακολούθηση θερμοκρασίας με το θερμόμετρο: model ST_DOWN, Serial No. 805029).

Τα πιο αραιά διαλύματα προκύπτουν από το διάλυμα συγκέντρωσης 5 ppm, σύμφωνα με το νόμο της αραιώσης:

$$c_1 V_1 = c_2 V_2 \quad (1)$$

όπου c_1 : αρχική συγκέντρωση σε ppm c_2 : τελική συγκέντρωση σε ppm
 V_1 : ζητούμενος όγκος σε ml V_2 : όγκος της φιάλης σε ml

1,3-DCP πυκνό διάλυμα παρακαταθήκης (stock solution)

Ομοίως προς την προετοιμασία του CH, παρασκευάστηκε το διάλυμα παρακαταθήκης της 1,3-DCP με ζύγιση 0.0109 g (10.9 mg) υγρής ουσίας και διάλυση σε μεθανόλη. Η μετάγγιση έγινε με μικροσύριγγα. Το νέο διάλυμα παρακαταθήκης έχει συγκέντρωση 1090 ppm. Από αυτό παρασκευάστηκε το ενδιάμεσο σε συγκέντρωση 5 ppm.

CH + 1,3-DCP πυκνό διάλυμα παρακαταθήκης (stock solution)

Ομοίως, παρασκευάστηκε ένα ενδιάμεσο διάλυμα 5 ppm με ταυτόχρονη προσθήκη και των δυο ουσιών σε ογκομετρική φιάλη (10 ml).

2.2.5 ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕΘΑΝΟΛΗ

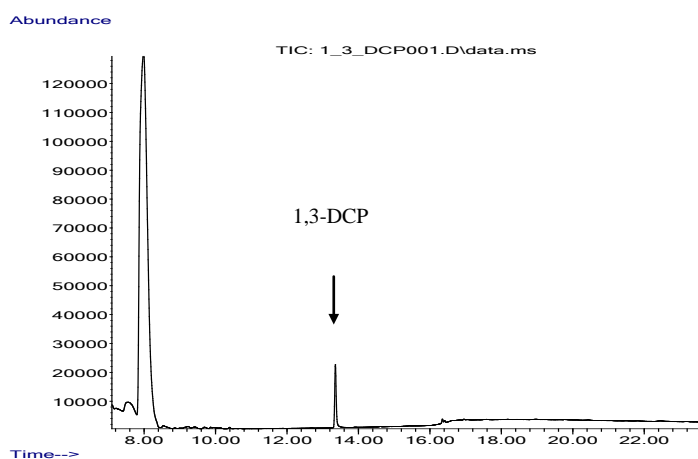
Πειραματικό – Συνθήκες GC-MS

Αρχικά, λόγω της ασταθούς δομής του CH (αποσυντίθεται στους 98 °C) η δοκιμή ανίχνευσής του έγινε σε διαλύτη CH₃OH σε συγκέντρωση 1 ppm που όμως δεν εμφάνισε την αναμενόμενη κορυφή. Στο πρόβλημα που ανέκυψε η λύση για επιλογή διαφορετικού διαλύτη θα ήταν η πιο κατάλληλη. Ωστόσο, ο προορισμός της μεθόδου για προσδιορισμό του CH σε δείγματα στο πόσιμο νερό απέτρεψε την αρχική σκέψη για ανάλυση του CH με απευθείας διάλυσή του σε διαλύτη. Σε αυτή τη λύση συνετέλεσε η σύγκριση των χρωματογραφημάτων με εκείνα τα χρωματογραφήματα δειγμάτων συναδέλφων (Πέτσα και Τσιούμα) από το τρέχον πρόγραμμα ανάλυσης με την εν λόγω ουσία. Οι εν λόγω συνάδελφοι μεταχειρίζονταν τα διαλύματα των προσδιοριζόμενων συστατικών ως δείγματα. Η αναλυτική διαδικασία περιελάμβανε την αραιώση του πυκνού διαλύματος παρακαταθήκης του CH στην επιθυμητή συγκέντρωση (π.χ. 1 ppm), μέτρηση όγκου από το αραιωμένο διάλυμα, προσθήκη άλατος και διαλύτη, ανακίνηση του φιαλιδίου και εκχύλιση της ουσίας από την υδατική στην οργανική φάση, μεταφορά της υπερκείμενης οργανικής στιβάδας σε φιαλίδιο και ανάλυση με την τεχνική GC-ECD. Η αναλυτική διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία περιελάμβανε τα προαναφερθέντα στάδια και επιπλέον φυγοκέντρηση (για προστασία της στήλης GC από τα υπολείμματα άλατος), μεταφορά της υπερκείμενης φάσης (π.χ. 900 μ L) σε φιαλίδιο και ανάλυση με GC-MS. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της στήλης της GC που επιλέχθηκε για την ανάλυση του δείγματος του CH είναι 50 °C (1 min, 5 °C/min) \rightarrow 80 °C (15

$^{\circ}\text{C}/\text{min}$) $\rightarrow 160^{\circ}\text{C}$. Η επιλογή του συγκεκριμένου προγράμματος βασίστηκε στις συνθήκες του οργάνου της GC-ECD (Nikolaou *et al.*, 2005) και προσαρμόστηκε στις συνθήκες του GC-MS, λαμβάνοντας υπόψη τα τεχνικά χαρακτηριστικά της στήλης και το σημείο ζέσεως της προσδιοριζόμενης ουσίας για τον CH (σ.ζ. $96-98^{\circ}\text{C}$). Επιλέχθηκε ο τρόπος παρακολούθησης των ιόντων SIM: 47, 82, 84, 111 (m/z). Επίσης δοκιμάστηκε και ο τρόπος SCAN, όμως απορρίφθηκε διότι δε φαινόταν η κορυφή του CH.

Η ανάλυση της 1,3-DCP σε CH_3OH σε συγκέντρωση 1 ppm εμφάνισε την κορυφή της (Χρωματογράφημα 1). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της στήλης GC ήταν 50°C (1 min, $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) $\rightarrow 200^{\circ}\text{C}$ ($50^{\circ}\text{C}/\text{min}$) $\rightarrow 230^{\circ}\text{C}$ (7 min) (Schuhmacher *et al.* (2005)). Ο τρόπος παρακολούθησης των ιόντων έγινε με SIM στα 43, 49, 79, 81 (m/z). Η εισαγωγή του δείγματος και για τις δυο ενώσεις ήταν pulsed injection. Ο συγκεκριμένος τρόπος είναι χρήσιμος στην ιχνοανάλυση, επιτρέπει την εισαγωγή μεγαλύτερων όγκων σε σύγκριση με τον τρόπο splitless, ελαττώνει την πιθανότητα αποσύνθεσης του δείγματος και συνιστάται για ευπαθείς ουσίες. Η ροή ρυθμίστηκε στα 1,8 ml/min. Το gain factor, που πολλαπλασιάζει το σήμα των κορυφών, ήταν 1.

Μολονότι η 1,3-DCP ανιχνεύθηκε σε CH_3OH , η δυσκολία ανίχνευσης του CH δεν κατέστησε δυνατή την ανάλυση των ουσιών με απευθείας διάλυση σε CH_3OH . Η λύση δόθηκε με την κατάρτιση μιας πειραματικής διάταξης που περιελάμβανε παρασκευή δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης μετά από εκχύλιση σε διαλύτη καθώς και προτύπων σε διαφορετικό διαλύτη για την κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης.



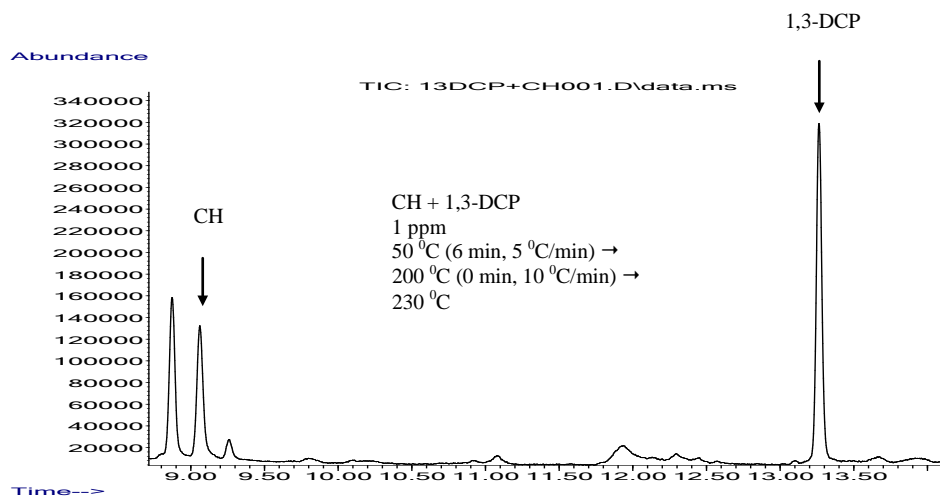
Χρωματογράφημα 1: Διάλυμα 1,3-DCP σε CH_3OH 1 ppm

2.2.6 ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ GC

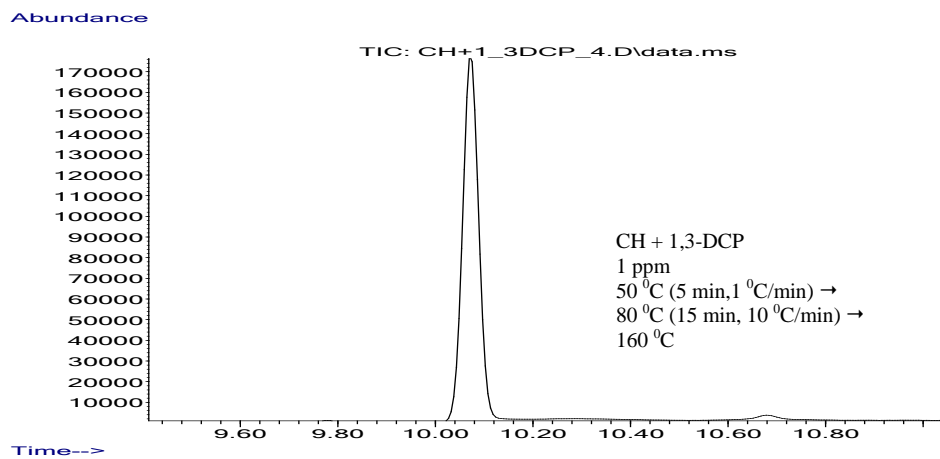
Τα θερμοκρασιακά προγράμματα επιλέχθηκαν από έρευνες που είχαν αντικείμενο μελέτης τον CH και την 1,3-DCP στο πόσιμο νερό και διέφεραν μεταξύ τους. Οι δοκιμές εστιάστηκαν στην ανίχνευση του CH στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα της 1,3-DCP και το αντίστροφο. Η συγκεκριμένη ενέργεια είναι απόρροια της λογικής ότι αν η μια ουσία ανιχνευτεί σε θερμοκρασιακό πρόγραμμα της δεύτερης τότε μπορούν να προστεθούν στο κοινό τους διάλυμα με την προϋπόθεση ότι δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Η συγκέντρωση 1 ppm δίνει υψηλές κορυφές και η επιλογή της συγκεκριμένης συγκέντρωσης έγινε για λόγους ευκρίνειας των κορυφών (Πίνακας 12).

Πίνακας 8: Δοκιμές σε διάφορα θερμοκρασιακά προγράμματα

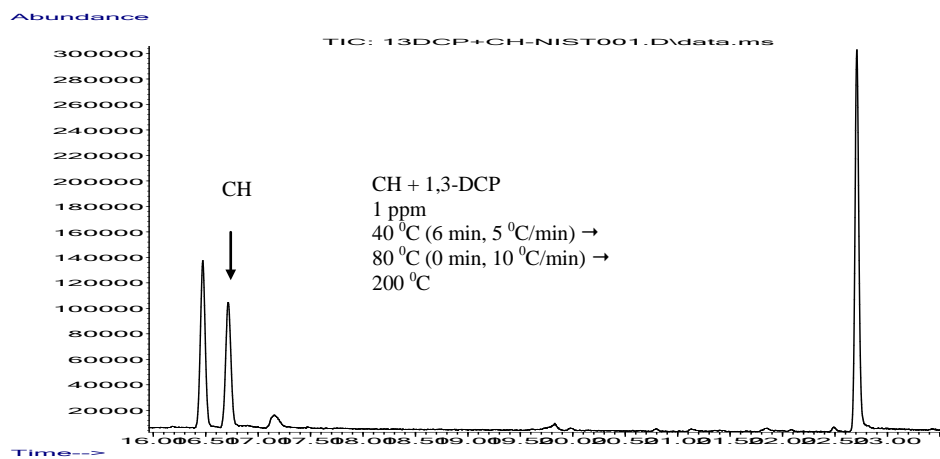
Ουσία	Θερμοκρασιακό πρόγραμμα στήλης GC	Αναφορά	Παρατηρήσεις
CH 1 ppm	50 °C (1 min, 10 °C/min) → 200 °C (0 min, 50 °C/min) → 230 °C (7 min)	Schuhmacher 2005	
	50 °C (1 min, 5 °C/min) → 80 °C (0 min, 15 °C/min) → 160 °C	Νικολάου 2001 σελ 80	
	40 °C (6 min, 5 °C/min) → 80 °C (0 min, 10 °C/min) → 200 °C	NIST WebBook	
	35(5 min, 2 °C/min) → 55 °C (1 min, 5 °C/min) → 100 (1 min, 40 °C/min) → 200 °C (5 min)	Koudjonou 2006	
	50 °C (1 min, 10 °C/min) → 200 °C (0 min)		
1,3-DCP 1 ppm	50 °C (1 min, 10 °C/min) → 200 °C (0 min, 50 °C/min) → 230 °C (7 min)	Schuhmacher 2005	
	50 °C (1 min, 5 °C/min) → 80 °C (0 min, 15 °C/min) → 160 °C	Νικολάου 2001 σελ 80	
	40 °C (6 min, 5 °C/min) → 80 °C (0 min, 10 °C/min) → 200 °C	NIST WebBook	
	35(5 min, 2 °C/min) → 55 °C (1 min, 5 °C/min) → 100 (1 min, 40 °C/min) → 200 °C (5 min)	Koudjonou 2006	
	50 °C (1 min, 10 °C/min) → 200 °C (0 min)		
CH + 1,3-DCP 1 ppm	50 °C (1 min, 10 °C/min) → 200 °C (0 min, 50 °C/min) → 230 °C (7 min)	Schuhmacher 2005	Κορυφές και των δυο ουσιών
	50 °C (1 min, 5 °C/min) → 80 °C (0 min, 15 °C/min) → 160 °C	Νικολάου 2001 σελ 80	Μόνο η κορυφή του CH
	40 °C (6 min, 5 °C/min) → 80 °C (0 min, 10 °C/min) → 200 °C	NIST WebBook	Κορυφές και των δυο ουσιών
	35(5 min, 2 °C/min) → 55 °C (1 min, 5 °C/min) → 100 (1 min, 40 °C/min) → 200 °C (5 min)	Koudjonou 2006	Κορυφές και των δυο ουσιών
	50 °C (1 min, 10 °C/min) → 200 °C (0 min)		Κορυφές και των δυο ενώσεων



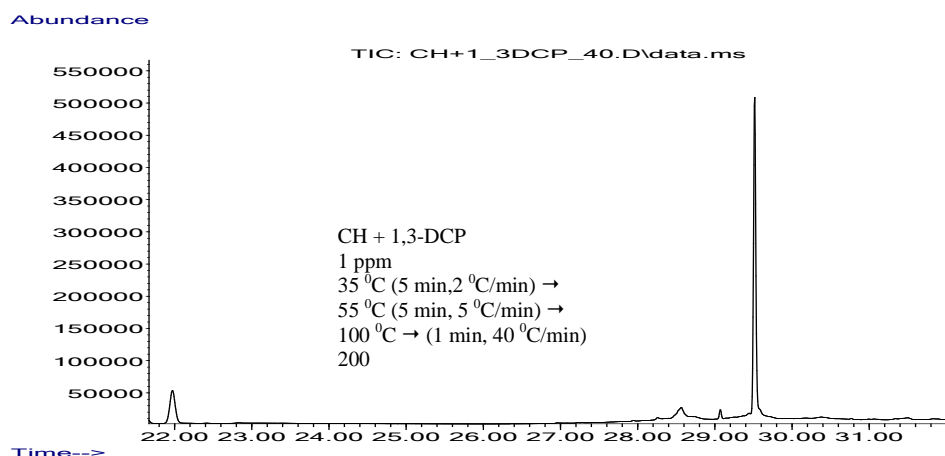
Χρωματογράφημα 2: CH + 1,3-DCP σε κοινό διάλυμα 1 ppm



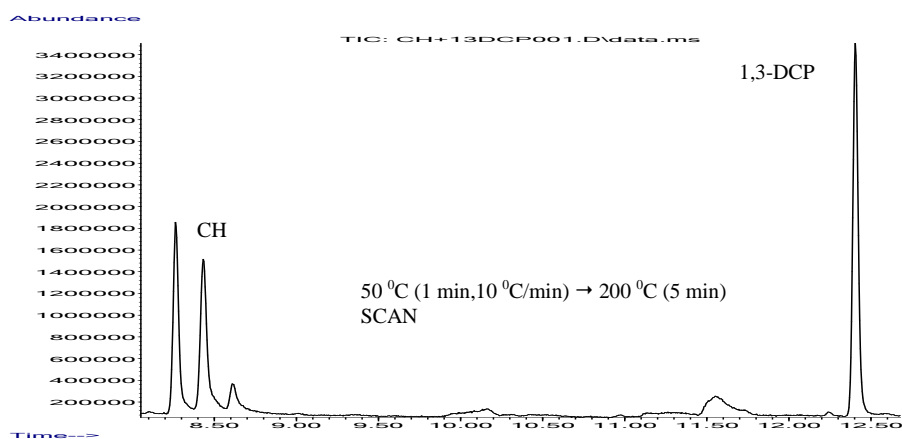
Χρωματογράφημα 3: CH + 1,3-DCP σε κοινό διάλυμα 1 ppm



Χρωματογράφημα 4: CH + 1,3-DCP σε κοινό διάλυμα 1 ppm



Χρωματογράφημα 5: CH + 1,3-DCP σε κοινό διάλυμα 1 ppm



Χρωματογράφημα 6: CH + 1,3-DCP σε κοινό διάλυμα 1 ppm

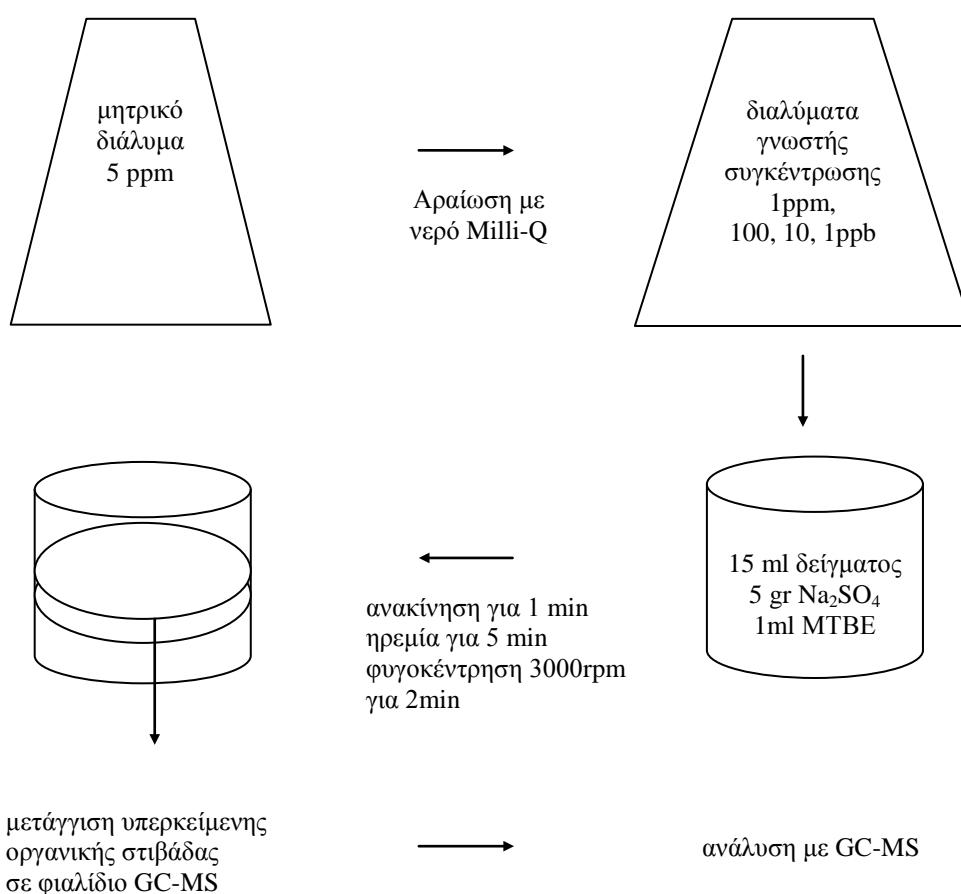
2.2.7 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΩΝ

Η προετοιμασία των διαλυμάτων αφορούσε δυο είδη, τα πρότυπα διαλύματα και τα «δείγματα». Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του οργάνου. «Δείγματα» ονομάστηκαν διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης που προέκυψαν από αραιώση των ενδιάμεσων διαλυμάτων 5 ppm και ακολούθησαν την πειραματική διάταξη (Σχήμα 18). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις λευκών (blanks) διαλυμάτων (δηλαδή απουσία των προσδιοριζόμενων ουσιών) για να εκτιμηθούν οι επιπτώσεις των παρεμποδίσεων στη γραμμή υποβάθρου.

Τα δείγματα παρασκευάστηκαν από το ενδιάμεσο διάλυμα 5 ppm με αραιώση. Τα μητρικά παραμένουν 15 λεπτά σε θερμοκρασία εργαστηρίου (20-24 °C) προτού αραιωθούν. Τα δείγματα παρασκευάζονται σε ογκομετρικές φιάλες χωρητικότητας 100 ml. Η φιάλη

γεμίζεται με υπερκάθαρο νερό της Milli-Q έως τη μέση και προστίθεται η ουσία. Ο όγκος συμπληρώνεται έως τη χαραγή, η φιάλη πωματίζεται και ανακινείται 5 φορές. Το συγκεκριμένο διάλυμα αποτελεί το «δείγμα». 15 ml δείγματος από το νέο διάλυμα μεταφέρονται σε σκουρόχρωμες κυλινδρικές φιάλες χωρητικότητας 40 ml. Με τη σειρά που αναφέρονται προστίθενται 5 gr Na_2SO_4 και 1 ml MTBE, η φιάλη πωματίζεται και ανακινείται για 1 λεπτό χειροκίνητα. Η φιάλη παραμένει σε ηρεμία για 5 λεπτά προτού τοποθετηθεί στη συσκευή φυγοκέντρησης (3000 rpm για 2 min) για την προστασία της στήλης GC από την περίσσεια του άλατος. Γίνεται μετάγγιση της υπερκείμενης φάσης σε φιαλίδιο GC-MS με σύριγγα εμπορίου μιας χρήσης και τοποθετείται στις υποδοχές του αυτόματου δειγματολήπτη GC-MS για ανάλυση.

Τα πρότυπα διαλύματα για την καμπύλη βαθμονόμησης έγιναν με αραιώση από το ενδιάμεσο διάλυμα των 5 ppb (μητρικό) σε διαλύτη MTBE. Οι αραιώσεις έγιναν σε ογκομετρικές φιάλες των 10 ml για ελάττωση του όγκου των αποβλήτων.



Σχήμα 18: Στάδια προετοιμασίας δειγμάτων.

2.2.8 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΕ ΔΙΑΛΥΤΕΣ

Η ανάκτηση (R) εκφράζει την ακρίβεια της μεθόδου και υπολογίζεται με βάση την τιμή της μετρούμενης συγκέντρωσης σε ένα δείγμα, όταν είναι γνωστή η πραγματική τιμή του είτε από πιστοποίηση, είτε από προσθήκη από τον αναλυτή είτε από εφαρμογή άλλης πρότυπης μεθόδου. Υπολογίζεται από τη σχέση

$$R\% = \frac{x_j}{\mu} 100 \quad (2)$$

όπου x_j η τιμή της μετρούμενης συγκέντρωσης και μ η πραγματική συγκέντρωση

Η ανάκτηση για κάθε ένωση είναι το ποσοστό % που ποσοτικοποιεί το όργανο και υπολογίζεται από το λόγο της προσδιοριζόμενης συγκέντρωσης της ουσίας από το όργανο προς την πραγματική και χαρακτηρίζει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου.

Στα πλαίσια της επιλογής του κατάλληλου διαλύτη πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στους διαλύτες MTBE, EA και DCM για εύρεση της βέλτιστης ανάκτησης. Η επιλογή των διαλυτών βασίστηκε σε πρότερες μεθόδους της βιβλιογραφίας. Ο διαλύτης MTBE αποτελεί το διαλύτη εκχύλισης της EPA 551,1, ο E.A. είναι διαλύτης με ικανοποιητικές ανακτήσεις για την 1,3-DCP στον ποσοτικό προσδιορισμό με GC-MS (Nyman *et al.*, 2003). Το DCM αποτελεί διαλύτη εκχύλισης για τον CH και τους μεταβολίτες του (Yan *et al.*, 1999). Τα κοινά διαλύματα CH + 1,3-DCP αραιώθηκαν σε συγκέντρωση 50 ppb (θεωρητική συγκέντρωση). Η πραγματική συγκέντρωση είναι 750 ppb, όπως υπολογίζεται από τη σχέση (6) διότι ο όγκος συμπυκνώνεται μετά την εκχύλιση. Η συγκέντρωση για κάθε ουσία μεταβάλλεται διότι από τον αρχικό όγκο 15 ml υδατικής φάσης συμπυκνώνεται κατά τη μεταφορά της σε 1 ml οργανικής φάσης.

Πειραματικό – Συνθήκες GC-MS

Από το ενδιάμεσο διάλυμα των 5 ppm προετοιμάστηκαν έξι δείγματα με διαλύτη εκχύλισης το MTBE, τέσσερα με το EA και τέσσερα με το DCM σε ξεχωριστά φιαλίδια GC-MS. Η θεωρητική συγκέντρωση των δειγμάτων ήταν 50 ppb και η πραγματική 750 ppb (Σχέση 6). Στο MTBE και EA η οργανική φάση σχηματιζόταν υπεράνω της υδατικής. Κατά την εκχύλιση με DCM και μετά την ανακίνηση, παρατηρήθηκε σχηματισμός ελαιώδους στιβάδας. Η οργανική στιβάδα που είχε τη μορφή σφαίρας, κατακάθισε στον πυθμένα του σκουρόχρωμου φιαλιδίου. Ο σχηματισμός της οργανικής στιβάδας κατέστησε αναγκαία την προσεκτική μεταφορά του μικροόγκου μέσω σύριγγας από τον πυθμένα. Η εισαγωγή δείγματος με splitless, SIM των ιόντων: 82, 84, 111, 113. Παρατηρήθηκε ότι στο δεύτερο δείγμα η ανάκτηση είναι καλύτερη. Η επικάλυψη των χρωματογραφημάτων ανα δυο καθιστά δυνατή τη σύγκριση ανάμεσα στους διαλύτες. Κατόπιν σύγκρισης ανάμεσα στους τρεις

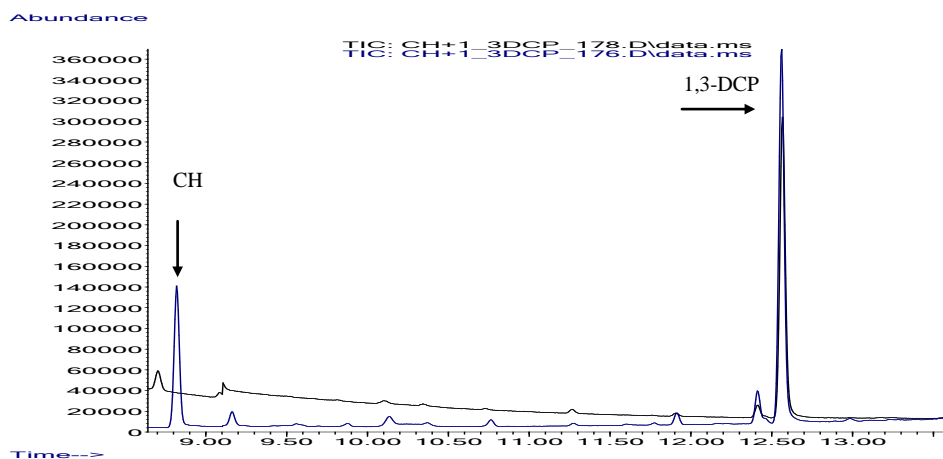
διαλύτες, παρατηρείται ότι οι ανακτήσεις στο διαλύτη MTBE είναι οι καλύτερες (Πίνακας 9). Με τον DCM η ανάκτηση του CH είναι μικρή όπως και στον EA και άλλοτε δεν υπολογίζεται. Η κορυφή του CH στον EA φαίνεται καλή (Χρωματογραφήματα 7, 8) αλλά ήταν αδύνατο να υπολογιστεί η ανάκτηση.

Πίνακας 9: Συγκεντρωτικός πίνακας για την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης σε συγκέντρωση 50 ppb

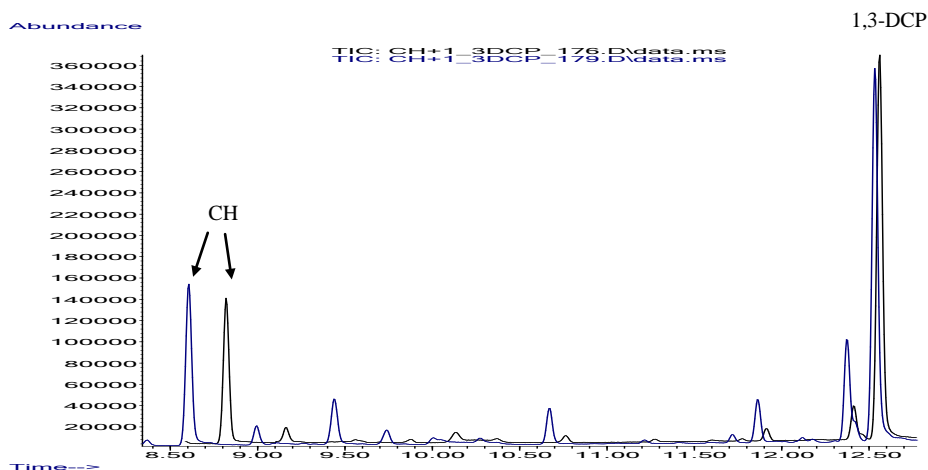
Ουσία	Διαλύτης	Συγκέντρωση	Αποτελέσματα – Παρατηρήσεις
CH + 1,3-DCP	MTBE Μέθοδος EPA 551.1	50 ppb δείγμα	Έδωσε καλές κορυφές για την 1,3-DCP.
CH + 1,3-DCP	Ethyl acetate (EA)	50 ppb δείγμα	Έδωσε καλές κορυφές και για τις δυο ενώσεις.
CH + 1,3-DCP	DCM	50 ppb δείγμα	Δίνει καλή κορυφή της 1,3-DCP αλλά όχι του CH.
Συνθήκες οργάνου: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 50 ^o C (1 min, 10 ^o C/min) → 200 ^o C (0 min, 50 ^o C/min) → 230 ^o C (7 min) Splitless, SIM: Θραύσματα 82, 84, 111, 113			

Πίνακας 10: Διαλύτες εκχύλισης MTBE, EA, DCM και οι % ανακτήσεις

Διαλύτης	Ανακτήσεις (%)	
	CH	1,3-DCP
MTBE	43	70
MTBE	63	95
MTBE	60	90
MTBE	65	102
MTBE	63	96
MTBE	-	70
E.A.	-	82
E.A.	-	86
E.A.	2	85
E.A.	3	88
DCM	-	50
DCM	-	57
DCM	1	25
DCM	0,2	37



Χρωματογράφημα 7: Σύγκριση κορυφών δείγματος CH και 1,3-DCP 50 ppb (750 ppb) και εκχύλιση σε α) E.A. β) DCM



Χρωματογράφημα 8: Σύγκριση κορυφών δείγματος 50 ppb (750 ppb) CH και 1,3-DCP και εκχύλιση σε α) EA β) MTBE

2.2.9 ΠΟΛΛΑΠΛΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ

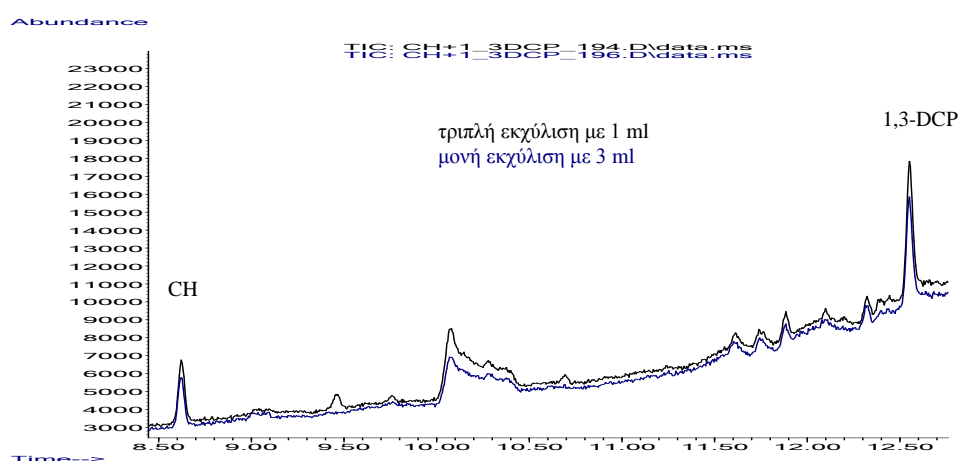
Παρασκευάζεται το δείγμα κανονικά μέχρι και το στάδιο προσθήκης του Na_2SO_4 και του διαλύτη MTBE (Σχήμα 18). Ανακινείται για 1 min και οι φάσεις διαχωρίζονται στη συσκευή φυγοκέντρησης. Η περίσσεια του στερεού Na_2SO_4 καθιζάνει στον κώνο του σωλήνα. Προσέχοντας να μην περάσει στερεό στη σύριγγα μεταγγίζουμε την υπερκείμενη φάση σε σωλήνα φυγοκέντρησης με κωνική απόληξη και τη φυλάσσουμε. Επαναλαμβάνοντας τα παραπάνω στάδια προσθέτουμε 5 gr Na_2SO_4 και 1 ml MTBE πραγματοποιώντας δεύτερη εκχύλιση. Μεταγγίζουμε τη δεύτερη υπερκείμενη φάση στο σωλήνα που περιέχει και την πρώτη οργανική φάση. Από το συνολικό όγκο των δυο υπερκείμενων φάσεων προσθέτουμε όγκο ίσο με 900 μL , περίπου, σε φιαλίδιο GC-MS για ανάλυση. Με τον ίδιο τρόπο πραγματοποιείται και η τρίτη εκχύλιση. Τα δείγματα όπως και

τα πρότυπα φυλάσσονται στο ψυγείο προτύπων του εργαστηρίου στους 2-7 °C έως το τέλος των πειραμάτων.

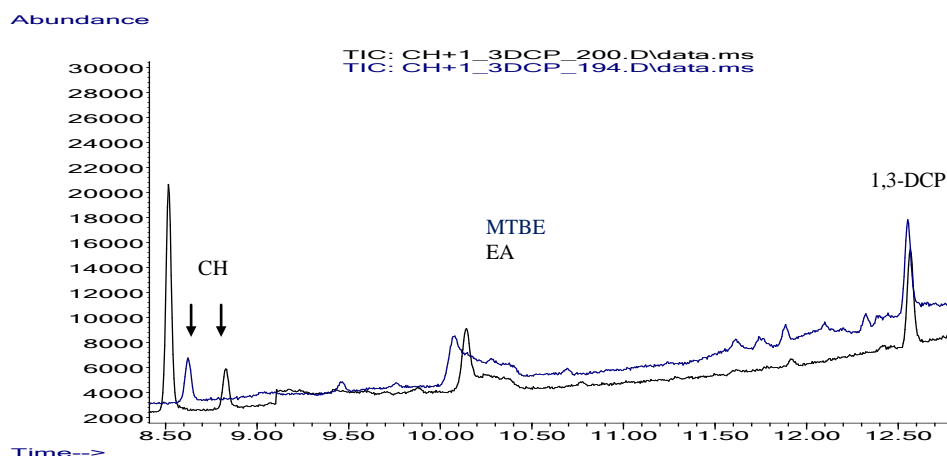
Οι πολλαπλές εκχυλίσεις έγιναν σε δυο διαλύτες MTBE και E.A. με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης ανάκτησης. Πραγματοποιήθηκαν στο κοινό διάλυμα των ουσιών CH + 1,3-DCP συγκέντρωσης 3 ppb (θεωρητική) και υπολογίστηκαν οι πραγματικές συγκεντρώσεις (Σχέση 5). Η τριπλή εκχύλιση με 1 ml διαλύτη MTBE έδωσε καλύτερες κορυφές από την απλή εκχύλιση με 3 ml MTBE (Χρωματογράφημα 9). Η τριπλή εκχύλιση με 1 ml διαλύτη MTBE εμφανίζει καλύτερες κορυφές από το διαλύτη EA (Χρωματογράφημα 10).

Πίνακας 11: Διαλύτες εκχύλισης και οι ανακτήσεις

Πραγματική συγκέντρωση (ppb)	Όγκος διαλύτη εκχύλισης	Εκχυλίσεις	Ανακτήσεις (%)	
			CH	1,3DCP
22,5	2 ml MTBE	2	73	88
22,5	2 ml MTBE	2	76	97
45	1 ml MTBE	1	60	81
45	1 ml MTBE	1	56	82
45	1 ml MTBE	3	82	106
45	1 ml MTBE	3	79	104
15	3 ml MTBE	1	62	89
15	3 ml MTBE	1	67	84
15	1 ml MTBE	1	70	99
15	1 ml MTBE	1	77	104
15	1 ml E.A.	3	n.d.	89,5
15	1 ml E.A.	3	n.d.	89,0



Χρωματογράφημα 9: Σύγκριση χρωματογραφημάτων διαλύματος 3 ppb CH + 1,3-DCP μετά από τριπλή εκχύλιση με 1 ml (μπλε) και μονή εκχύλιση με 3 ml (μαύρο)



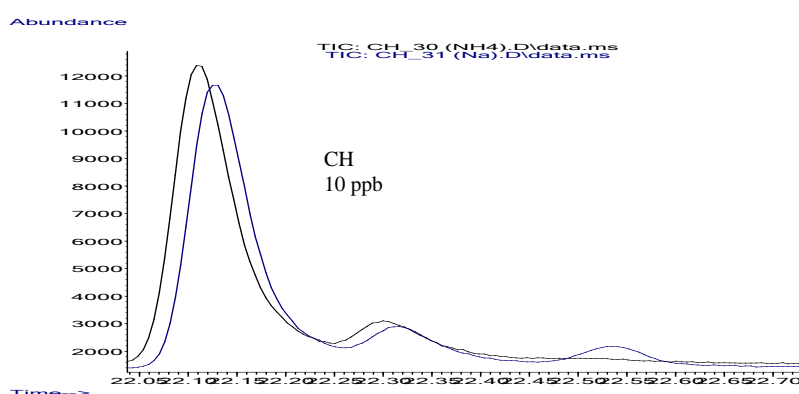
Χρωματογράφημα 10: Σύγκριση χρωματογραφημάτων διαλύματος 3 ppb CH + 1,3-DCP μετά από τριπλή εκχύλιση με 1 ml σε MTBE και EA.

2.2.10 ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΛΑΤΟΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ

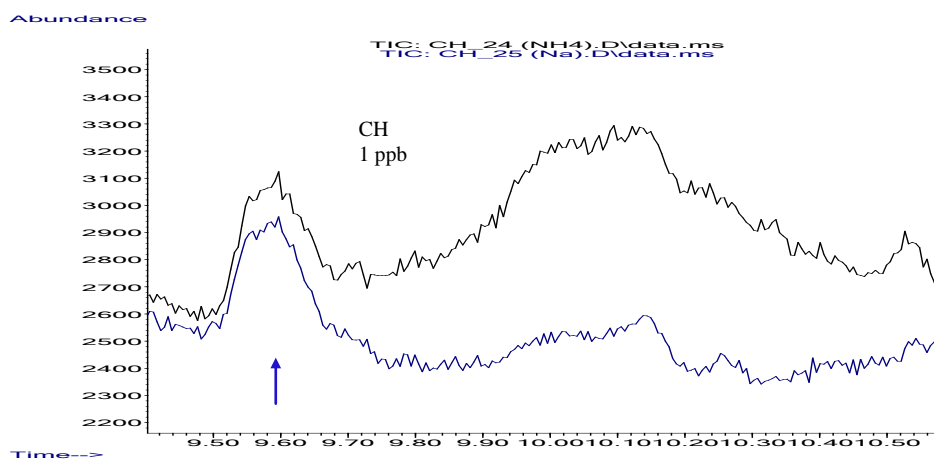
Κατά την επιλογή του άλατος προέκυψαν δυο δυσκολίες. Η μια αφορούσε στο είδος του άλατος και η δεύτερη στην ποσότητά του. Στη μέθοδο που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό της 1,3-DCP (Schuhmacher *et al.*, 2005) το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ήταν το άλας που χρησιμοποιήθηκε. Στη μέθοδο για τον προσδιορισμό του CH (Nikolaou *et al.*, 2005) χρησιμοποιήθηκε Na_2SO_4 . Για την επιλογή μεταξύ των δυο αλάτων οι δοκιμές ήταν αναγκαίες. Παρασκευάστηκαν 2 διαλύματα συγκέντρωσης 10 και 1 ppb, προστέθηκαν 10 g Na_2SO_4 και 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ σε δυο δείγματα (15 ml το καθένα), ο CH εκχυλίστηκε σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα, ανακινήθηκε για 1 λεπτό και τοποθετήθηκε σε συσκευή φυγοκέντρησης (1000 rpm/min). Το Na_2SO_4 έδωσε καλύτερο φάσμα μαζών (Φάσματα 4,5,6,7). Θερμοκρασιακό πρόγραμμα GC: 35 (5 min, 2 °C/min) → 55 (1 min, 5 °C/min) → 100 (1 min, 40 °C/min) → 200 (5 min), τρόπος εισαγωγής δείγματος: pulsed injection, τρόπος παρακολούθησης ιόντων MS: SIM (θραύσματα 29, 35, 47, 49, 82, 83, 84, 85, 111, 113),

Τα χρωματογραφήματα κατέγραφαν αλλοιωμένες τις κορυφές (συμπιεσμένες κορυφές ως προς το χρόνο συγκράτησης). Η αιτία δυσλειτουργίας του οργάνου αποδόθηκε στη συσσώρευση άλατος στο liner του εισαγωγέα. Η πρώτη διορθωτική ενέργεια που έγινε ήταν η αντικατάσταση του liner που όμως δε βελτίωσε την εικόνα των κορυφών. Η δια γυμνού οφθαλμού παρακολούθηση της στήλης φανέρωσε συσσώρευση ποσότητας άλατος που οφειλόταν στη μετάγγιση της οργανικής φάσης στο GC-MS, μέσω της σύριγγας. Έγιναν προσπάθειες καθαρισμού της στήλης με διέλυση CH_3OH (3 φορές) και E.A (2 φορές) αλλά το άλας παρέμενε δυσδιάλυτο στη στήλη. Το όργανο καθηλώθηκε σε ακινησία για διάστημα περίπου 2 μηνών. Το πρόβλημα αντιμετωπίστηκε με αφαίρεση εκατοστών από το άκρο της

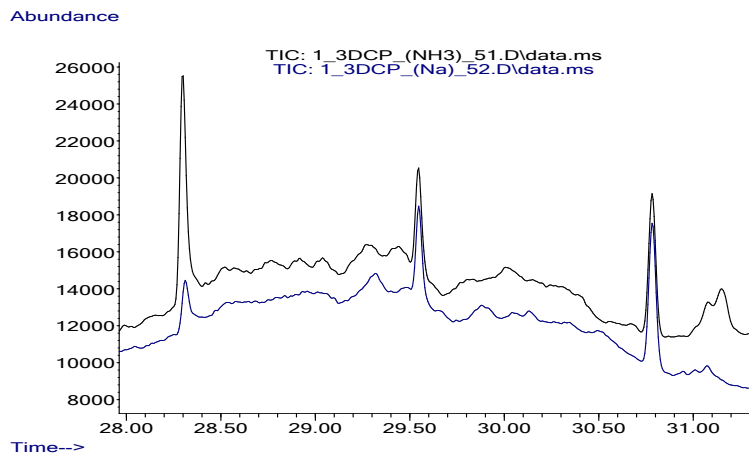
στήλης και διέλευση CH₃OH πολλές φορές. Το νέο μήκος της στήλης ρυθμίστηκε στο πρόγραμμα του οργάνου με αφαίρεση περίπου 3 μέτρων από το αρχικό μήκος 60 m. Η ανάγκη για άμεση ελάττωση του άλατος, η φυγοκέντρωση σε μεγαλύτερο ρυθμό (αύξηση των στροφών σε περισσότερο χρόνο) και η πιο προσεκτική μετάγγιση της οργανικής φάσης προτάθηκαν ως λύσεις άρσης του προβλήματος. Η ποσότητα του Na₂SO₄ ελαττώθηκε στη μισή 5 g για να συγκριθεί με την κορυφή στα 10 g. Από τα χρωματογραφήματα κρίθηκε ότι η ποσότητα 5 g επαρκεί για να αυξήσει την ιοντική ισχύ του CH βοηθώντας τη μεταφορά από την υδατική στην εστερική φάση διαμέσου της εκχύλισης.



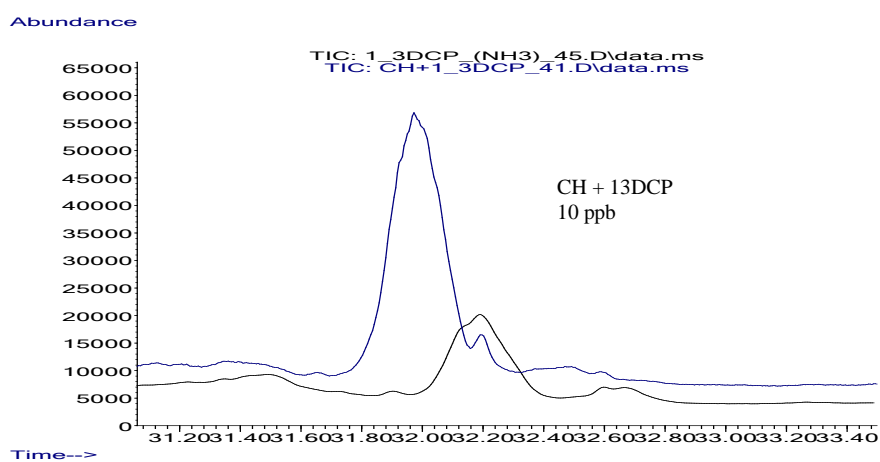
Χρωματογράφημα 11 : Σύγκριση άλατος Na₂SO₄ και (NH₄)₂SO₄ (10g) σε συγκέντρωση 10 ppb CH.



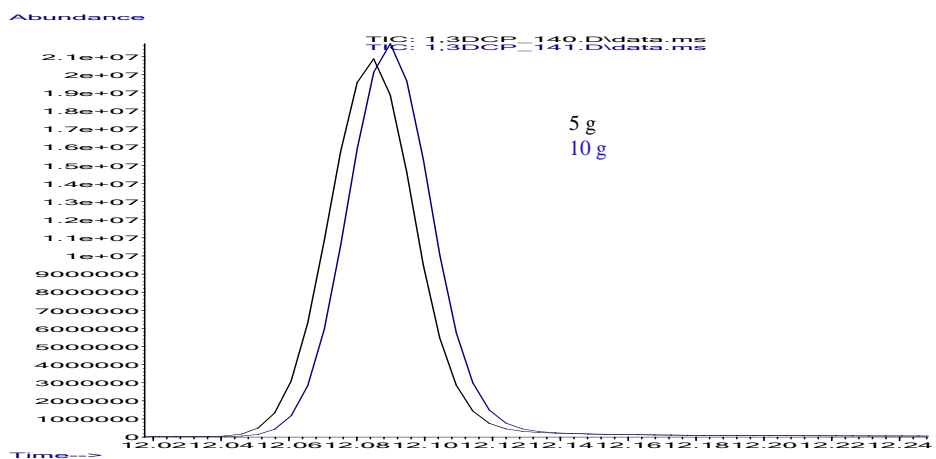
Χρωματογράφημα 12: Σύγκριση άλατος Na₂SO₄ και (NH₄)₂SO₄ (10g) CH σε 1 ppb.



Χρωματογράφημα 13: Σύγκριση άλατος Na_2SO_4 και $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10 g) 1,3-DCP σε 10 ppb



Χρωματογράφημα 14: Σύγκριση άλατος Na_2SO_4 και $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10 g) CH + 1,3-DCP σε 10 ppb



Χρωματογράφημα 15: Σύγκριση χρωματογραφημάτων σε 1 ppm CH με προσθήκη ποσοτήτων 5 και 10 g Na_2SO_4

2.2.11 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ

Γενικά

Κατά την εφαρμογή μιας μεθόδου ποσοτικής ανάλυσης, ο τελικός στόχος είναι η εύρεση της συγκέντρωσης του προσδιοριζόμενου συστατικού σε ένα άγνωστο δείγμα. Ο στόχος αυτός επιτυγχάνεται με βάση το γεγονός ότι ένα μέγεθος ή ιδιότητα του δείγματος (μετρούμενο μέγεθος) έχει κάποιας μορφής μαθηματική εξάρτηση (νόμο ή σχέση) από τη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού. Συνήθως, επιδιώκεται η μέτρηση μεγέθους που εξαρτάται γραμμικά από τη συγκέντρωση του συστατικού.

Συχνά όμως προκύπτουν σημαντικές αποκλίσεις από τη γραμμική ή άλλη σχέση εξάρτησης, οι οποίες οφείλονται είτε σε ενδογενείς παράγοντες του δείγματος, είτε στα στάδια της χημικής ανάλυσης, είτε στις συνθήκες μέτρησης του οργάνου, είτε στις δυνατότητες του εξοπλισμού, είτε στη δεξιότητα του αναλυτή, είτε τέλος και σε τυχαία γεγονότα. Για το λόγο αυτό, είναι πολλές φορές απαραίτητη η εφαρμογή κάποιας τεχνικής ποσοτικής αποτίμησης που να περιορίζει ή να ακυρώνει τις αποκλίσεις αυτές. Οι περισσότερες ενόργανες μέθοδοι ανάλυσης όπως είναι μεταξύ των άλλων και οι φασματοσκοπικές, χρωματογραφικές αποτελούν τις σχετικές μεθόδους. Η αποτίμηση στις σχετικές μεθόδους βασίζεται σε άλλες μετρήσεις που γίνονται σε πρότυπες ουσίες. Σε αυτές απαιτείται πάντοτε η παρασκευή προτύπων διαλυμάτων της προσδιοριζόμενης ουσίας και με βάση τις μετρήσεις τους προκύπτει ένα μοντέλο βαθμονόμησης με μορφή μαθηματικής εξίσωσης που συνδέει την ποσότητα ή τη συγκέντρωση της ουσίας με τη μετρούμενη ιδιότητα. Το πιο συνηθισμένο τέτοιο μοντέλο είναι η γραφική παράσταση μιας καμπύλης αναφοράς με μορφή ευθείας (Βουλγαρόπουλος, 1999).

Η καμπύλη αναφοράς της παρούσας μεθόδου προκύπτει από τα ζεύγη τιμών συγκέντρωσης – αφθονίας και έγινε με εξωτερική βαθμονόμηση πολλών σημείων. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η βέλτιστη δυνατή ακρίβεια με χρήση όσο γίνεται περισσότερων προτύπων, ώστε να περιορίζεται στο ελάχιστο η επίδραση των τυχαίων σφαλμάτων. Όσο περισσότερα πειραματικά σημεία χρησιμοποιούνται για τη χάραξη της τόσο περισσότερο αξιόπιστη και αντιπροσωπευτική είναι η καμπύλη αναφοράς (Βουλγαρόπουλος, 1999).

Η τεχνική της καμπύλης αναφοράς συνίσταται στην παρασκευή μιας σειράς προτύπων διαλυμάτων με γνωστή συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού, στη μέτρηση του μετρούμενου μεγέθους και στη χάραξη της ευθείας ελάχιστων τετραγώνων των τιμών ζευγών μετρούμενο μέγεθος – συγκέντρωση. Τέλος, γίνεται η αποτίμηση της συγκέντρωσης του προσδιοριζόμενου στοιχείου, με βάση την τιμή του μετρούμενου μεγέθους του άγνωστου δείγματος και την εξίσωση της ευθείας ελάχιστων τετραγώνων. Σε ορισμένες

περιπτώσεις είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί μη γραμμική καμπύλη αναφοράς για την ποσοτική εκτίμηση ενός στοιχείου, όμως οι εκτιμήσεις στη γραμμική περιοχή είναι σαφώς ακριβέστερες (Βουλγαρόπουλος, 1999).

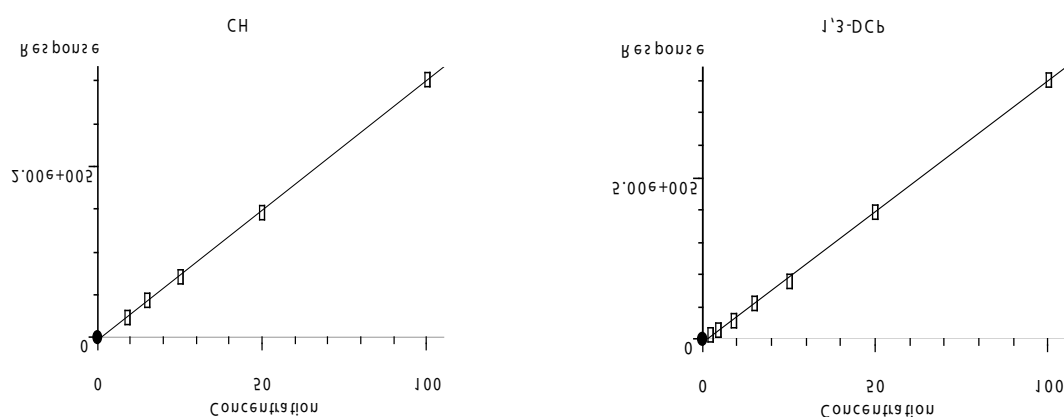
Πειραματικό

Η καμπύλη βαθμονόμησης αποτελεί μια γραφική παράσταση που αναπαριστά την απόκριση του οργάνου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα πρότυπα διαλύματα διαλύθηκαν σε Ε.Α. Παρασκευάστηκαν από το κοινό διάλυμα των 5 ppm (CH + 1,3-DCP) σε συγκεντρώσεις: 11,25, 22,5, 45, 90, 150, 250, 500 ppb και αναλύθηκαν με τη σειρά που αναφέρονται από το αραιό προς το πυκνό. Η αντίστροφη ακολουθία ανάλυσης από το πυκνό στο αραιό δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά στα χρωματογραφήματα. Παράλληλα, προετοιμάστηκαν και δυο λευκά διαλύματα (blank).

Οι συγκεντρώσεις των προτύπων επιλέχθηκαν βάσει της σχέσης που δίνει τις πραγματικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων εφόσον είναι γνωστές οι θεωρητικές τιμές. Οι πραγματικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων που θα συλλεχθούν από το πεδίο και θα αναλυθούν με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε στην εργασία θα προκύπτουν από τη σχέση:

$$\text{Συγκέντρωση πραγματική} = \text{συγκέντρωση θεωρητική} \times \frac{\text{ml δείγματος}}{\text{ml διαλύτη εκχύλισης}} \quad (3)$$

Η γραμμικότητα μιας καμπύλης βαθμονόμησης χαρακτηρίζεται από το γραμμικό συντελεστή συσχέτισης. Όταν $r > 0,99$ η γραμμικότητα είναι ικανοποιητική ενώ όταν $r > 0,999$ τότε η γραμμικότητα είναι εξαιρετική. Στην περίπτωση των καμπυλών βαθμονόμησης των δυο ουσιών η γραμμικότητα είναι καλή (Πίνακας 12, Σχήμα 19).



Σχήμα 19: Καμπύλες βαθμονόμησης για τον CH και την 1,3-DCP

Πίνακας 12: Καμπύλες βαθμονόμησης και r^2

Καμπύλη Βαθμονόμησης	Γραμμικός συντελεστής συσχέτισης r^2	Εξίσωση $y = \alpha C + \beta$
CH	0,999787	$y = 3035x - 3445,7$
1,3-DCP	0,999699	$y = 8095x - 11350$

Πίνακας 13: Συγκεντρώσεις και αποκρίσεις του MS για τον CH κατά την κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης

CH πρότυπο διάλυμα σε MTBE	Συγκέντρωση ppb	Απόκριση οργάνου Σχετική αφθονία
	100	301245
	50	145633
	25	72119
	15	43496
	9	24284
	4,5	-
	2,25	-

Πίνακας 14: Συγκεντρώσεις και αποκρίσεις του MS για την 1,3-DCP κατά την κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης

1,3 DCP πρότυπο διάλυμα σε MTBE	Συγκέντρωση ppb	Απόκριση οργάνου Σχετική αφθονία
	100	800857
	50	392334
	25	182133
	15	109738
	9	59014
	4,5	29204
	2,25	12808

2.2.12 ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Το όριο ανίχνευσης (LOD) ορίζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου στοιχείου σε διάλυμα, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί με βεβαιότητα 99,6% (Βουλγαρόπουλος, 1999). Στην πράξη εκφράζει τη συγκέντρωση του στοιχείου που δίνει τιμή μέτρησης ίση με τη μέση τιμή των μετρήσεων μιας σειράς από λευκούς προσδιορισμούς, αυξημένη κατά το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης s_b αυτών των προσδιορισμών. Το όριο ανίχνευσης πρακτικά υπολογίζεται από τα δεδομένα των συντελεστών καμπύλης βαθμονόμησης (κλίση και τεταγμένη επι την αρχή των αξόνων).

$$LOD = \frac{(3s) - b}{a} \quad (4)$$

Για τον CH η τυπική απόκλιση για τη συγκέντρωση 10 ppb είναι 3696 και για την 1,3-DCP είναι 2173. Από τις εξισώσεις των καμπυλών βαθμονόμησης συνάγεται ότι η κλίση για τον CH είναι $\alpha = 3035$ και η τεταγμένη επι την αρχή $\beta = -3445,7$. Για την 1,3-DCP η κλίση είναι $\alpha = 8095$ και η τεταγμένη επι την αρχή $\beta = 11350$.

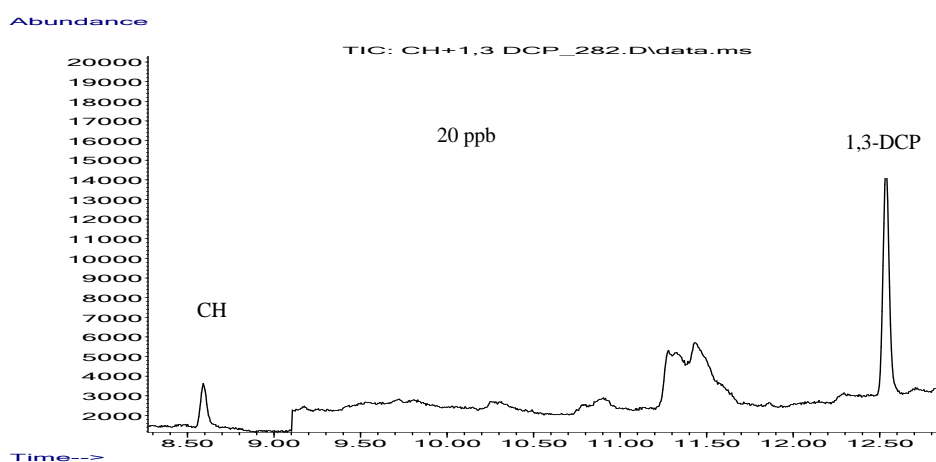
Η μάζα ποσοτικοποίησης για τον CH είναι το 82 και για την 1,3-DCP η μάζα 79. Η ποσοτικοποίηση των κορυφών γίνεται με αυτόματη ολοκλήρωση της περιοχής που περικλείεται στο χωρίο μεταξύ της κορυφής και της γραμμής υποβάθρου.

Το όριο ποσοτικοποίησης προκύπτει από το όριο ανίχνευσης (Πρότυπη διαδικασία, 2009):

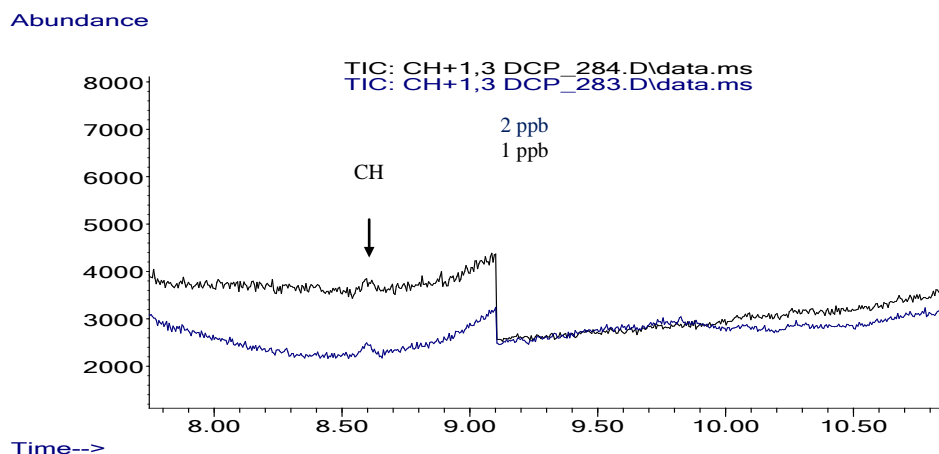
$$LOQ = 3 LOD \quad (5)$$

Πίνακας 15: Όρια ποσοτικοποίησης LOQ για τον CH και την 1,3-DCP σε κοινό διάλυμα

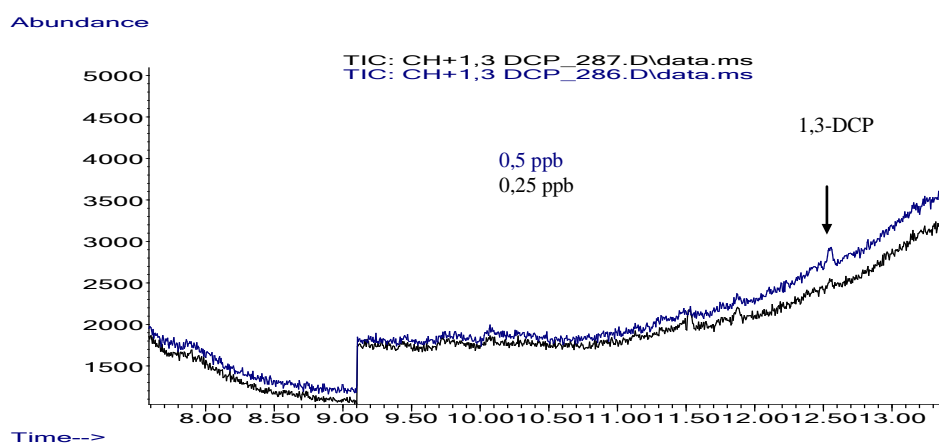
Ουσία	Συγκέντρωση σε ppb LOD	Συγκέντρωση σε ppb LOQ
CH	4,8	14,4
1,3-DCP	2,2	6,6



Χρωματογράφημα 16: Κορυφές CH + 1,3-DCP σε κοινό διάλυμα MTBE συγκέντρωσης 20 ppb.



Χρωματογράφημα 17: Σύγκριση κορυφών σε κοινό διάλυμα MTBE σε συγκεντρώσεις 1-2 ppb.



Χρωματογράφημα 18: Σύγκριση κορυφών 1,3-DCP σε κοινό διάλυμα MTBE σε συγκεντρώσεις 1-2 ppb.

2.2.13 ΕΥΡΕΣΗ ΣΧΕΤΙΚΗΣ ΤΥΠΙΚΗΣ ΑΠΟΚΛΙΣΗΣ

Η σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας υπολογίζεται από τη σχέση:

$$RSD = \frac{100 * S}{\bar{X}} \quad (6)$$

Πίνακας 16: Σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας

	CH			1,3-DCP		
	10 ppb	50 ppb	100 ppb	10 ppb	50 ppb	100 ppb
RSD	10,6	5,2	4,2	12,1	7,2	8,5

Παρατηρείται ότι η σχετική τυπική απόκλιση αυξάνεται καθώς ελαττώνεται η συγκέντρωση. Οι τιμές της RSD υπολογίστηκαν από μια σειρά πειραμάτων που περιελάμβαναν Παρασκευή διαλυμάτων σε συγκεντρώσεις 10, 50, 100 ppb με 6 επαναλήψεις

στην κάθε συγκέντρωση. Η διαδικασία επαναλήφθηκε δυο φορές στα ίδια δείγματα σε δυο διαφορετικές ημέρες.

2.2.14 ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΥΛΙΚΟΥ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ

Liner: Το liner ανήκει στα υλικά αναλώσιμα και αποτελεί υλικό του οργάνου GC για την προστασία της στήλης. Είναι ένας διάτρητος, κυλινδρικός σωλήνας που εφαρμόζεται εκατέρωθεν του εισαγωγέα. Η αντικατάσταση του liner γίνεται όπου κρίνεται απαραίτητο π.χ. όταν εμφανίζονται κορυφές άγνωστες σε σύγκριση με προηγούμενα χρωματογραφήματα και οφείλονται σε προσμίξεις. Για την προστασία από σοβαρά εγκαύματα κατά την αντικατάσταση του liner, είναι απαραίτητη η ελάττωση της θερμοκρασίας του εισαγωγέα π.χ. στους 50 °C.

Διάφραγμα: Το διάφραγμα (septum) είναι το υλικό από τεφλόν που απομονώνει τη στήλη από την εξωτερική πίεση (ατμοσφαιρική) και αποκλείει τη διείσδυση του αέρα. Η αλλαγή του διαφράγματος είναι απαραίτητη όταν στα χρωματογραφήματα εμφανίζονται κορυφές άγνωστες λόγω προσμίξεων. Απαιτείται η ελάττωση της θερμοκρασίας του εισαγωγέα (50 °C) για την αποφυγή σοβαρών εγκαυμάτων.

2.2.15 ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

Τα απόβλητα από τις εκπλύσεις των σκευών και τα διαλύματα συγκεντρώνονται σε πλαστικό δοχείο και διατίθενται στην εταιρία Τεχνική Προστασίας Περιβάλλοντος Α.Ε.ερε με έδρα τον Πειραιά. Με τη σειρά της η εταιρία τα μεταχειρίζεται ως επικίνδυνα απόβλητα του Εργαστηρίου και τα διαθέτει στην εταιρία Indaver NV με έδρα το Βέλγιο.

Τα αναλώσιμα σκεύη όπως είναι οι πιπέτες (Pasteur, επαναληπτικών σιφωνίων), γυάλινα σκεύη (σπασμένα, ραγισμένα), υλικός εξοπλισμός οργάνου (liner, septum) φυλάσσονται στο εργαστήριο «Προκατεργασία Δειγμάτων» για μελλοντική διάθεση σε εταιρίες διαχείρισης αναλώσιμων υλών εργαστηρίων.

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εύρεση εργασιών με αντικείμενο μελέτης τις ξεχωριστές μεθόδους προσδιορισμού του CH και της 1,3-DCP οδήγησαν σε αναζήτηση μιας κοινής μεθόδου προσδιορισμού. Η ανάπτυξη της μεθόδου εστιάστηκε στη συγκεκριμένη καινοτομία. Τα πειραματικά ευρήματα των ξεχωριστών μεθόδων οδήγησαν στην παρασκευή κοινού διαλύματος παρακαταθήκης και δοκιμές, αρχικά, στις συνθήκες του CH και της 1,3-DCP. Βάσει των δοκιμών σε διαφορετικά θερμοκρασιακά προγράμματα επιλέχθηκε το πρόγραμμα 50 °C (1 min, 10 °C/min) → 200 °C (0 min, 50 °C/min) → 230 °C (7 min). Στο πρόγραμμα γινόταν εισαγωγή του δείγματος στους 50 °C και παραμονή για 1 λεπτό, αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 10 °C/min έως τους 200 °C, αύξηση της θερμοκρασίας έως τους 230 °C με ρυθμό 50 °C/min και παραμονή για 7 λεπτά. Με τον τρόπο αυτό γινόταν καθαρισμός της στήλης από τις προσδιοριζόμενες ουσίες, πιθανές προσμίξεις και προετοιμασία για την επόμενη ανάλυση. Ο διαλύτης CH₃OH χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης συντήρησης των διαλυμάτων παρακαταθήκης αλλά βρέθηκε ακατάλληλος για την ανάλυση. Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκε μια πειραματική διάταξη που περιελάμβανε παρασκευή διαλυμάτων σε γνωστές συγκεντρώσεις, τα επονομαζόμενα δείγματα, εκχύλιση των ουσιών σε διαλύτη, προσθήκη άλατος για την αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος και καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων, εκχύλιση με χειροκίνητη ανακίνηση, παραμονή σε ηρεμία, φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 2 λεπτά και εισαγωγή στο GC-MS. Οι δοκιμές σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες MTBE, EA, DCM, έδειξαν ότι ο διαλύτης με τις καλύτερες ανακτήσεις είναι ο MTBE. Αφενός ο MTBE έχει καλύτερες ανακτήσεις και αφετέρου αποτελεί το διαλύτη εκχύλισης της επίσημης μεθόδου προσδιορισμού του CH (EPA 551,1). Οι δοκιμές σε πολλαπλές εκχυλίσεις στον εν λόγω διαλύτη έδειξαν ότι η τριπλή εκχύλιση σε 1 ml ανα εκχύλιση είχε τις βέλτιστες ανακτήσεις. Η επιλογή του άνυδρου άλατος Na₂SO₄ κρίθηκε η πιο κατάλληλη λόγω των καλύτερων κορυφών και για τις δυο ουσίες. Η ελάττωση της ποσότητας του άλατος από 10 g σε 5 g αποτελεί μια βελτιωμένη ενέργεια της μεθόδου για την προστασία της στήλης και την επίτευξη του, τεχνικώς, βέλτιστου δυνατού διαχωρισμού των φάσεων. Τα όρια ανίχνευσης LOD της κοινής μεθόδου είναι 4,8 ppb για τον CH και 2,2 ppb για την 1,3-DCP. Η καμπύλη βαθμονόμησης για την κάθε ουσία χωριστά κατασκευάστηκε με 5 πρότυπα διαλύματα για τον CH και 7 για την 1,3-DCP. Η γραμμικότητα των καμπυλών είναι καλή.

4. ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

- 5 gr Na_2SO_4 αντί για 10 gr
- Φυγοκέντρηση δείγματος για διαχωρισμό των φάσεων υδατική/οργανική 3000rpm/2min αντί 1000rpm/1min
- Αντικατάσταση ΕΑ από MTBE ως διαλύτη εκχύλισης δειγμάτων
- Πολλαπλές εκχυλίσεις με διαλύτη MTBE για καλύτερες ανακτήσεις, 3 εκχυλίσεις με 1 ml MTBE ($3 \times 1 = 3 \text{ ml}$)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

1. Βαλαβανίδης, Α., (2006) *Φασματομετρία Οργανικών Ενώσεων*, Κεφάλαιο 12, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
2. Βουλγαρόπουλος, Α., Ζαχαριάδης, Γ., Στράτης, Ι. (1999) *Εισαγωγή στην ποσοτική χημική ανάλυση*, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη, σελίδες 155-170.
3. ΕΥΔΑΠ Α.Ε. (2005) Τελική έκθεση του έργου, *Εναλλακτικές μέθοδοι απολύμανσης του πόσιμου νερού*, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Τμήμα Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Ποιότητας Υδάτων και Αέρα, Επιστημονικός υπεύθυνος Θεμιστοκλής Λέκκας.
4. Κουϊμτζής, Θ., Φυτιάνος, Κ., Σαμαρά-Κωνσταντίνου, Κ. (2001) *Έλεγχος Ρύπανσης Περιβάλλοντος*, University Studio Press.
5. McMurry J., (1998) *Οργανική Χημεία, Κεφάλαιο 12^ο, Προσδιορισμός της δομής: Φασματομετρία μαζών και φασματομετρία υπερύθρου*, Τόμος Ι: 549, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
6. Νικολάου, Ν. (2001) *Οργανικά Παραπροϊόντα Χλωρίωσης στο πόσιμο νερό*, Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μυτιλήνη
7. Παπαδογιάννης, Ι.Ν., Σαμανίδου, Β.Φ. (2001) *Ενόργανη Χημική Ανάλυση*, Εκδόσεις Πήγασος 2000, Θεσσαλονίκη, σελίδες 206-226
8. Πρότυπη διαδικασία λειτουργίας του εργαστηρίου ποιότητας υδάτων και αέρα, Επικύρωση των μεθόδων, ΠΔΛ_5,4_01, 27/01/2009
9. Τοσσίδης, Ι. (2003) *Η ανόργανη Χημεία με ερωτήσεις*, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη
10. Τσίπη, Κ., Παλαμιτζόγλου, Π., Δερπάνη, Δ. (2003) *Λεξικό της χημείας*, Μαλλιάρης παιδεία.

ΞΕΝΗ

11. Agilent, Lab Monitor & Diagnostic Software, Λογισμικό Υλικό Οργάνου
12. Allegaert, K., Daniels, H., Naulaers, G., Tibboel, D., Devlieger, H. (2005) *Pharmacodynamics of chloral hydrate in former preterm infants*, European Journal of Pediatrics, 164: 403-407
13. Ballesteros-Gomez, A., Rubio, S., Perez-Bendito, D. (2009) *Analytical methods for the determination of bisphenol A in food*, Journal of Chromatography A, 1216, pages 449-469, Elsevier.
14. Bronley-DeLancey, A., McMillan, D.C., McMillan J.M., Jollow, D.J., Mohr, L.C., Hoel, D.G. (2006) *Application of Cryopreserved Human Hepatocytes in Trichloroethylene Risk*

- Assessment: Relative Disposition of Chloral Hydrate to Trichloroacetate and Trichloroethanol*, Environmental Health Perspectives, Volume 114, Number 8.
15. Chemical aspects 8, *Guidelines for drinking-water quality*, pp. 162-165
 16. CMP (2004) Potential sources and uses of chemicals considered in the WHO *Guidelines for Drinking-water Quality*, 24EDIT2, Part C, Appendix 1.
 17. Delinsky, A.D., Bruckner, J.V., Bartlett, M.G. (2005) *A review of analytical methods for the determination of trichloroethylene and its major metabolites chloral hydrate, trichloroacetic acid and dichloroacetic acid*, Biomedical Chromatography, Wiley InterScience
 18. Duran-Alvarez, J.C. (2009) Becerril-Bravo, E., Castro, S.V., Jimenez, B., Gibson, R., “*The analysis of a group of acidic pharmaceuticals, carbamazepine and potential endocrine disrupting compounds in wastewater irrigated soils by gas chromatography-mass spectrometry*”, accepted manuscript, Talanta.
 19. Henderson, G.N., Yan, Z., James, M.O., Davydova, N., Stacpoole, P.W. (1997) *Kinetics and Metabolism of Chloral Hydrate in children: Identification of Dichloroacetate as a Metabolite*, Biochemical and biophysical research communications 235, 695-698, Article No. RC976868, Elsevier.
 20. Kitson, F., Larsen, B., McEwen C.N. (1996) “*Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A practical guide*”, Academic Press, USA.
 21. Koudjonou, B.K., LeBel, G.L. (2006) *Halogenated acetaldehydes: Analysis, stability and fate in drinking water*, Chemosphere 64, pages 795-802, Elsevier.
 22. Koudjonou, B., LeBel, G., Dabeka, L. (2008) *Formation of halogenated acetaldehydes and occurrence in Canadian drinking water*, Chemosphere 72, pages 875-881, Elsevier.
 23. Lee, J.C., Shin, I.S., Kim, K.H., Moon, C., Kim, S.H., Shin, D.H., Park, S.C., Kim, Y.B., Kim, J.C., (2009), *Developmental toxic potential of 1,3-dichloro-2-propanol in Sprague-Dawley rats*, Regulatory Toxicology and Pharmacology 53, pages 63-69, Elsevier.
 24. Lepom, P., Brown, B., Hanke, G., Loos, R., Quevauviller, P., Wollgast, J. (2009) *Review: “Needs for reliable analytical methods for monitoring chemical pollutants in surface water under the European water framework directive”*, Journal of Chromatography A, 1216, pages 302-315.
 25. L’Huillier, N., Pratten, M.K., Clothier, R.H. (2002) *The relative embryotoxicity of 1,3-dichloro-2-propanol on primary chick embryonic cells*, Toxicology in Vitro 16, pages 433-442, Pergamon.
 26. Ma, L., Zhu, J.W., Yuan, X.Q., Yue, Q. (2007) *Synthesis of epichlorohydrin from dichloropropanols: Kinetic Aspects of the process*, Trans IChemE, Part A, Chemical Engineering Research and Design, Volume 85 (A12), 1580-1585, China.

27. McNair, H., Miller, J. (1998) *Basic Gas Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc. United States of America.
28. Merdink, J.L., Rodison, L.M., Stevens, D.K., Hu, M., Parker, J.C., Bull, R.J. (2008) *Kinetics of chloral hydrate and its metabolites in male human volunteers*, Toxicology 245:130-140, Elsevier
29. MUT/01/06, *Committee on the mutagenicity of chemicals in food, consumer products and the environment, 1,3-DCP*, Draft.
30. National Toxicology Program, (NTP), National Institute of Environmental Sciences (NIEHS) (2005) *1,3-dichloro-2-propanol, Review of Toxicological Literature*, North Carolina
31. Nikolaki, M.D., Malamis, D., Pouloupoulos S.G., Philippopoulos C.J., (2006) *Photocatalytical degradation of 1,3-dichloro-2-propanol aqueous solutions by using an immobilized TiO₂ photoreactor*, Journal of Hazardous Materials B 137, 1189-1196, Elsevier.
32. Nikolaki, M.D., Philippopoulos, C.J. (2007) *Photochemical degradation of 1,3-dichloro-2-propanol aqueous solutions*, Journal of Hazardous Materials 146, pages 674-679, Elsevier.
33. Nikolaou, A., Golfinopoulos, S., Rizzo, L., Lofrano, G., Lekkas, T., Belgiorno, V. (2005) *Optimization of analytical methods for the determination of DBPs: Application to drinking waters from Greece and Italy*, Desalination 176, pages 25-36, Elsevier.
34. Nomeir, A.A., Kato, S., Matthews, H.B. (1981) *The metabolism and disposition of Tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (Fyrol FR-2) in the rat*, Academic Press Inc, Oxicology and applied pharmacology 57, 401-413
35. Nyman, P.J., Diachenko, G.W., Perfetti, G.A. (2003) *Determination of 1,3-dichloropropanol in soy and related sauces by using gas chromatography/mass spectrometry*, Food Additives and Contaminants, Vol. 20, No. 10, pages 903-908, Taylor & Francis.
36. Orecchio, S., Paradiso Ciotti, V., Culotta, L. (2009) *Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coffee brew samples: Analytical method by GC-MS, profile, levels and sources*”, Food and Chemical Toxicology, Elsevier.
37. Pietrogrande, M.C., Basaglia, G. (2007) *GC-MS analytical methods for the determination of personal-care products in water matrices*, Trends in analytical chemistry, vol. 26, No. 11.
38. Porazzi, E., Martinez, M.P., Fanelli, R., Benfenati, E. (2005) *GC-MS analysis of dichlobenil and its metabolites in groundwater*, Talanta 68, pages 146-154.
39. Richardson, S.D., Plewa, M.J., Wagner, E.D., Schoeny, R., DeMarini, D.M. (2007) *Occurrence, genotoxicity and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-*

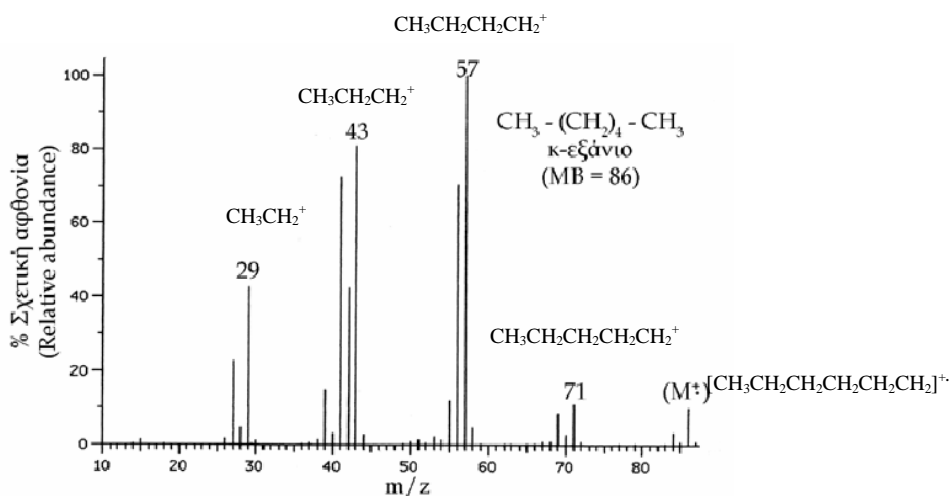
- products in drinking water: A review and roadmap for research*, Mutation Research 636 (2007) 178-242, Elsevier
40. Schmitt, T.C. (2002) *Determination of chloral hydrate and its metabolites in blood plasma by capillary gas chromatography with electron capture detection*, Journal of Chromatography B, 780, pages 217-224.
 41. Schuhmacher, R., Nurmi-Legat, J., Oberhauser, A., Kainz, M., Krška, R. (2005) *A rapid and sensitive GC-MS method for determination of 1,3-dichloro-2-propanol in water*, Springer-Verlag 2005, Analytical Bioanalytical Chemistry 382:366-371
 42. Solvay Chemicals, Inc. (2003) *Epichlorohydrin Properties*
 43. Wajner, M., de Moura Coelho D., Ingrassia, R., Anderson Büker de Oliveira, Estela Natacha Brandt Busanello, Kimiyo Raymond, Ricardo Flores Pires, Carolina Fischinger Moura de Souza, Roberto Giugliani, Carmen Regla Vargas, (2009) *Selective screening for organic acidemias by urine organic acid GC-MS analysis in Brazil: Fifteen-year experience*, Clinica Chimica Acta, Volume 400, Issues 1-2, February 2009, Pages 77-81, Elsevier.
 44. Weber, G., Sipes, I.G. (1992) *In Vitro Metabolism and Bioactivation of 1,2,3-Trichloropropane*, Academic Press Inc., Toxicology and applied pharmacology 113, 152-158
 45. WHO (2000) *Concise International Chemical Assessment Document 25, Chloral Hydrate*, Geneva.
 46. WHO (2000) *Environmental Health Criteria 216, Disinfectants and Disinfectant by-products*, Geneva.
 47. WHO (2005) *Chloral Hydrate in Drinking-water, Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*, Geneva, (WHO/SDE/WSH/05.08/49).
 48. WHO (2006) *Guidelines for Drinking-water Quality*, First addendum to third edition, Volume 1, Recommendations. -3rd edition, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
 49. WHO (2002) Technical Report Series No. 909, *Evaluation of certain food additives and contaminants*, 57th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, page 114, 118-121.
 50. WHO (2006) Technical Report Series No. 940, *Evaluation of certain food additives and contaminants*, 67th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Rome, Italy
 51. WHO (2006) JECFA/67/SC, *Summary and Conclusions, Toxicological recommendations and information on specifications*, Joint FAO/WHO Expert Committee on food Additives, 67th meeting, Rome

52. WHO (2007) IPCS, *WHO Food additives series: 58, Safety evaluation of certain food additives and contaminants*, 67th meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva
53. Wolthers, B.G., Kraan, G.P.B. (1999) *Clinical applications of gas chromatography and gas chromatography – mass spectrometry of steroids*, *Journal of Chromatography A*, 843, pages 247-274, Elsevier.
54. Xu, X., Ren, Y., Wu, P., Han, J., Shen, X. (2006) The simultaneous separation and determination of chloropropanols in soy sauce and other flavouring with gas chromatography-mass spectrometry in negative chemical and electron impact ionization modes, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 23:2, 110-119, Taylor & Francis.
55. Yan, Z., Henderson, G.N., James, M.O., Stacpoole, P.W. (1999) *Determination of chloral hydrate metabolites in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 19:309-318.

ΙΣΤΟΤΟΠΟΙ

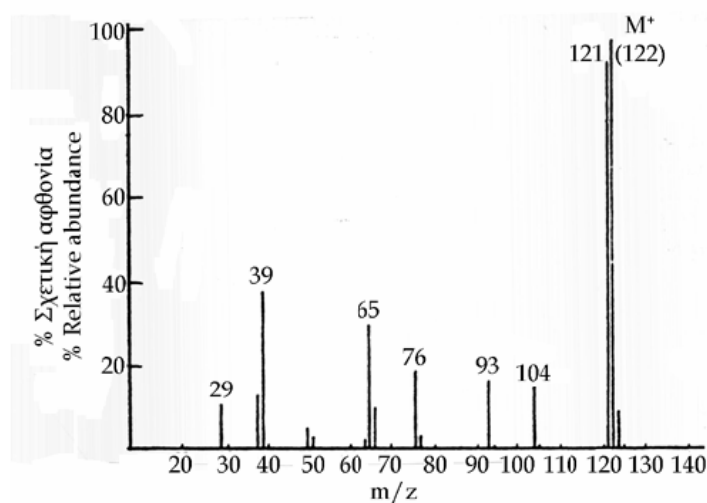
1. IPCS: Monographs – analytical and toxicological data (6.24-6.25)
http://www.who.int/ipcs/publications/training_poisons/basic_analytical_tox/en/index9.html (ενημερώθηκε τελευταία 26.03.2009)
2. EPA: Chronic Health Hazard Assessments for Noncarcinogenic Effects, Chloral Hydrate.
<http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0304-tr.pdf> (26.03.2009)
3. NIST Chemistry WebBook <http://webbook.nist.gov/chemistry>
(ενημερώθηκε τελευταία 18.03.2009)
4. WHO (2000) Environmental Health Criteria 216, Disinfectants and disinfectant by-products, Geneva http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc_216/en/
5. EPA: *National Primary Drinking Water Regulations: Disinfectants and Disinfection Byproducts*, Federal Register: December 16, 1998 (Volume 63, Number 241), Rules and Regulations, Page 69389-69476, From the Federal Register Online via GPO Access
<http://www.epa.gov/EPAWATER/1998/December/Day-16/w32887.htm>
(ενημερώθηκε τελευταία 18.03.2009)
6. Μπακέας, 2008, Αεριοχρωματογραφία
<http://www.chem.uoa.gr> , [SAT_Aerioxrwmatografia_2.pdf, 1656 KB](#)
7. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθήνας, τμήμα Χημείας, ιστοσελίδες μαθημάτων/εκπαιδευτικού υλικού, Βαλαβανίδης Α. (07/2006) Οργανική χημεία: Φασματομετρία, Κεφάλαιο 12
http://www.chem.uoa.gr/courses/organiki_1/fasm_org/Chapter_12.pdf,
(ενημερώθηκε τελευταία 09.02.2009)
8. IPCS, Chloral Hydrate, Concise International Chemical Assessment Document, No 25, Summary, WHO
<http://www.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?sesslan=1&codlan=1&codcol=38&codcch=25> (ενημερώθηκε τελευταία 21.03.2009)
9. Γενικό χημείο του κράτους , Εργαστηριακές δραστηριότητες
http://www.gcsf.gr/index.asp?a_id=18&txt=y&show_sub=1
(Ενημερώθηκε τελευταία 26.03.2009)

Παράρτημα



Φάσμα 3: Φάσμα μαζών του κ – εξανίου, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ (Βαλαβανίδης, 2006)

Παράδειγμα εύρεσης της υδροξυβενζαλδεΐδης από το φάσμα μαζών της με μοριακό τύπο $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$ και με μοριακό ιόν 122.



Φάσμα 4: Φάσμα μαζών της υδροξυβενζαλδεΐδης

Από το φάσμα μαζών φαίνεται ότι η φασματική γραμμή του M^+ είναι η ισχυρότερη (100% αφθονία). Το γεγονός αυτό και οι φασματικές γραμμές με m/e 76, 66, 65, 39 και 38 καθιστούν φανερή την ύπαρξη βενζολικού δακτυλίου. Επίσης η ελαφρά ισχυρότερη φασματική γραμμή με 121 (και η 29, που μπορεί να είναι CHO^+) δείχνουν ότι η ένωση μπορεί να είναι αρωματική αλδεΐδη. Το άλλο τμήμα του μορίου πρέπει να είναι υδροξύλιο (OH). Συνάγεται ότι πρόκειται για την υδροξυβενζαλδεΐδη.

Πίνακας 17: Προτεινόμενα φέροντα αέρια για ορισμένους ανιχνευτές (McNair, 1998)

Ανιχνευτής	Φέρον Αέριο
Θερμικής Αγωγιμότητας	He
Ιονισμού φλόγας	He ή N ₂
Δέσμευσης ηλεκτρονίου	Πολύ ξηρό N ₂ ή Ar, 5% CH ₄
Φασματοσκοπίας μαζών	He ή H ₂

Πίνακας 18: Συντελεστές κατανομής της 1,3-DCP σε μίγματα διαλυτών (Nomeir *et. al.*, 1981)

Σύστημα διαλυτών	Αναλογία μίξης	R _f
οξικός αιθυλεστέρας/χλωροφόρμιο	2:1	0,58
εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας/βενζόλιο	2:4:1	0,56
βενζόλιο/μεθανόλη	9:1	0,49
οξικός αιθυλεστέρας/αιθανόλη/νερό	10:2:1	0,87

Πίνακας 19: Συγκεντρώσεις 1,3-DCP σε καλλιέργειες δύο ειδών κυττάρων από έμβρυα νεοσσών, μέσου εγκεφάλου και καταβολής κάτω άκρων (L'Huillier *et al.*, 2002)

Ουσία έρευνας	Είδος καλλιέργειας	Time point (h)	LC ₅₀	IC ₅₀
1,3-DCP	κύτταρα μέσου εγκεφάλου εμβρύων νεοσσών	48	<10μM	<10μM
		72	<10μM	<10μM
		96	<10μM	<10μM
	κύτταρα καταβολής κάτω άκρων εμβρύων νεοσσών	48	<10μM	<10μM
		72	<10μM	<10μM
		96	<10μM	<10μM

Πίνακας 20: Οι τεχνικές φασματομετρίας, οι αρχές που τις διέπουν και εφαρμογές τους (Τοσσίδης, 2003)

Τεχνική Φασματομετρίας	Αρχή	Εφαρμογές
E.S.R	Μελετούνται οι ιδιότητες μορίων που περιέχουν μονήρη ηλεκτρόνια.	Μελέτη ενώσεων με μονήρη ηλεκτρόνια (π.χ. ελεύθερες ρίζες)
Ηλεκτρονική Φασματομετρία Φασματομετρία υπεριώδους-ορατού, UV-Vis	Μελέτη της αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας στην υπεριώδη και στην ορατή περιοχή του φάσματος με τις διάφορες χημικές ουσίες. Ανήκει στην ηλεκτρονική φασματομετρία. Προκαλεί διεγέρσεις ηλεκτρονίων της στιβάδας σθένους από μια επιτρεπτή στάθμη ενέργειας σε άλλη.	Παρέχει δομικές πληροφορίες για την έκταση της ηλεκτρονικής συζυγίας π στα οργανικά μόρια
Φασματομετρία μαζών	Προσδιορίζεται με ακρίβεια η σχετική μοριακή μάζα, M_r , διαφόρων ενώσεων ή ακόμη και η μάζα των θραυσμάτων που προκύπτουν κατά την προσβολή των μορίων τους από δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας.	Εύρεση του μοριακού βάρους διαφόρων ενώσεων, μελέτη της δομής του μορίου τους
Φασματομετρία Mössbauer	Βασίζεται στο συντονισμό των πυρήνων μιας ουσίας κατά τη απορρόφηση ακτινοβολίας γ (με συχνότητες της τάξης των 10^{19} Hz και μήκη κύματος 100 pm).	Μελέτη ενώσεων με βιολογικό ή τεχνολογικό ενδιαφέρον, μελέτη μηχανισμού διάβρωσης.
Φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, NMR	Βασίζεται στο συντονισμό των πυρήνων μιας χημικής ουσίας οι οποίοι με επίδραση εξωτερικού μαγνητικού πεδίου μεταπίπτουν από μια κατάσταση σπιν (ιδιοπεριστροφή) σε μια άλλη.	Διευκρίνιση της δομής του μορίου διαφόρων ενώσεων, χημική κινητική, κ.ά.
Φασματομετρία Raman	Μελετά τις διεγέρσεις δόνησης, περιστροφής του μορίου και τα ενεργειακά επίπεδα των μορίων με βάση το σκεδασμό ακτινοβολίας από αυτά.	Μελέτη κυρίως συμμετρικών μορίων ή δεσμών π.χ. H_2 , N_2 κ.ά.
Φασματομετρία Υπερύθρου, IR	Μελετούνται οι αλληλεπιδράσεις της ύλης με ακτινοβολία στην περιοχή του υπεριώδους (200-400nm) και του ορατού (400-800nm).	Στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση χημικών ουσιών Προσδιορίζει το είδος των λειτουργικών ομάδων που υπάρχουν στα μόρια

Πίνακας 21: Παράμετροι ελέγχου μιας τυπικής ανάλυσης με GC-MS

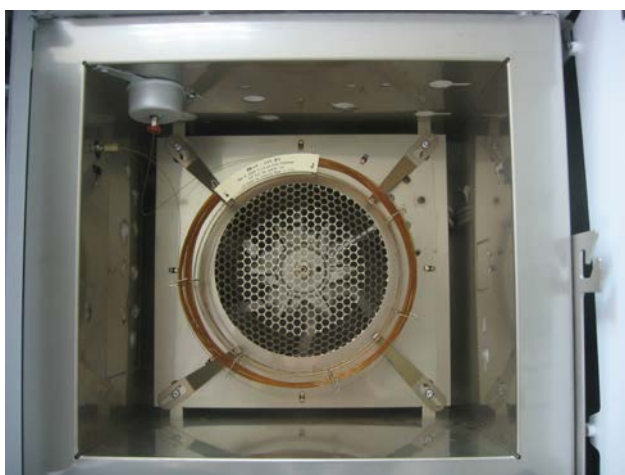
INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: 5975C	
C:\MSDCHEM\1\METHODS\CHLORALHYDRATE-HPVOC-SIM01.M	
Tue Nov 11 19:07:59 2008	
Control Information	
Sample Inlet	GC
Injection Source	GC ALS
Mass Spectrometer	Enabled
Oven	
Equilibration Time	0 min 50 °C for 1 min then 10 °C/min to 200 °C for 0 min
Oven Program	On
Run Time	16 min
Front Injector	
Syringe Size	10 µL
Injection Volume	2 µL
Injection Repetitions	1
Solvent A Washes (PreInj)	3
Solvent A Washes (PostInj)	3
Solvent A Volume	8 µL
Solvent B Washes (PreInj)	0
Sample Pumps	6
Dwell Time (PreInj)	0 min
Dwell Time (PostInj)	0 min
Solvent Wash Draw Speed	300 µL/min
Solvent Wash Dispense Speed	6000 µL/min
Sample Wash Draw Speed	300 µL/min
Sample Wash Dispense Speed	6000 µL/min
Injection Dispense Speed	6000 µL/min
Viscosity Delay	7 sec
Sample Depth	-2 mm
Back Injector	
Front SS Inlet He	
Mode	Splitless
Heater	On 250 °C
Pressure	On 7.7118 psi

Total Flow	On 104.3 mL/min
Septum Purge Flow	On 3 mL/min
Gas Saver	On 60 mL/min After 3.8 min
Purge Flow to Split Vent	100 mL/min at 2.7 min
Thermal Aux 2	{MSD Transfer Line }
Heater	On
Temperature Program	On 280 °C for 0 min
Run Time	16 min
Column	HP-VOC: 545.71552 HP-VOC 280 °C: 60 m x 320 µm x 1.8 µm
In	Front SS Inlet He
Out	Vacuum (Initial) 50 °C
Pressure	7.7118 psi
Flow	1.3 mL/min
Average Velocity	29.383 cm/sec
Holdup Time	3.4034 min
Flow Program	Off 1.3 mL/min for 0 min
Run Time	16 min
Signals	
Test Plot	Save Off
MS ACQUISITION PARAMETERS	
Tune File	atune.u
Acquisition Mode	SIM
MS Information	
Solvent Delay	7.00 min
EMV Mode	Gain Factor
Gain Factor	1.00
Resulting EM Voltage	1965
[Sim Parameters]	
GROUP 1	
Group ID	1
Resolution	Low
Plot 1 Ion	82.00

Ions/Dwell In Group	Mass: 29, 35, 47, 49, 82, 83, 84, 85, 111, 113 Dwell time: 10 x 30 msec = 300 msec (όχι περισσότερο από 300 msec)
[MSZones]	
MS Source	230 C maximum 250 C
MS Quad	150 C maximum 200 C
END OF MS ACQUISITION PARAMETERS	
TUNE PARAMETERS for SN: US71236707	
Trace Ion Detection is OFF	
EMISSION	34.610
ENERGY	69.922
REPELLER	28.615
IONFOCUS	89.208
ENTRANCE_LE	19.000
EMVOLTS	2235.294
Actual EMV	1964.71
GAIN FACTOR	1.00
AMUGAIN	1742.000
AMUOFFSET	121.500
FILAMENT	1.000
DCPOLARITY	0.000
ENTLENSOFFS	19.075
MASSGAIN	-708.000
MASSOFFSET	-41.000



Όργανο GC-MS εργαστηρίου «Χρωματογραφία Μάζας»



Στήλη HPVOC (60m x 320 μ m x 1.8 μ m, 545.71552)



Χώρος προετοιμασίας διαλυμάτων εργαστηρίου «Χρωματογραφία Μάζας» (Απαγωγός)

