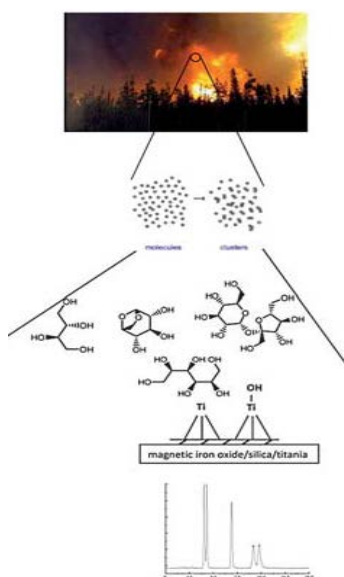




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ - ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΣΚΕΔΑΣΜΟΥ ΦΩΤΟΣ ΚΑΙ Ε-
ΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΕΡΟΛΥΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ
ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΕ ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΤΙΤΑΝΙΑ



Ευθυμία Κ. Παπαρίζου
Χημικός

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013

Ημερομηνία αίτησης της κ. Παπαρίζου Ευθυμίας: 10-6-13

Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ:

Σταλίκας Κων/νος, Αναπλ. Καθηγητής

Θέμα: «ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΕΡΟΛΥΜΑΤΩΝ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΣΚΕΔΑΣΜΟΥ ΦΩΤΟΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΕ ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΤΙΤΑΝΙΑ»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:

1. Σταλίκας Κων/νος, Αναπλ. Καθηγητής
2. Κονιδάρη Κωνσταντίνα, Επίκ. Καθηγήτρια
3. Σαγκάς Βασίλειος, Λέκτορας

Ο Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας

Τσίκαρης Βασίλειος, Καθηγητής

Η Γραμματέας του Τμήματος

Αδαμαντίου Ελένη

Στους ανθρώπους μου...

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με επιβλέποντα τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Κωνσταντίνο Σταλικά.

Η μεταπτυχιακή εργασία χωρίζεται σε τρία επιμέρους κεφάλαια, το θεωρητικό μέρος, το πειραματικό μέρος και τα αποτελέσματα-συζήτηση ενώ στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίηση αυτής της εργασίας.

Ιδιαίτερα θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στον επιβλέποντά μου, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Σταλικά, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, την ανεκτίμητη και συνεχή καθοδήγησή του, τις εύστοχες υποδείξεις, καθώς και για την αμέριστη συμπαράσταση και τις γνώσεις που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Διδάκτορα Ανδρέα Καραταπάνη, για την αποδοτική συνεργασία, τη συμπαράσταση και την βοήθεια που μου προσέφερε, καθώς και για τις εύστοχες παρεμβάσεις και τις πολύτιμες συμβουλές του. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Δρ. B. R. T. Simoneit για τη προσφορά της μαννοζάνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου.

Θερμές ευχαριστίες ανήκουν και στους φίλους και συναδέλφους μου, Αφροδίτη Σφακιανάκη, Άννα Καραμάνη, Δρ. Δημήτρη Στεργίου και Παναγιώτη Δημοβασίλη για τις εποικοδομητικές συζητήσεις, τις πολύτιμες συμβουλές, την αμέριστη βοήθεια και τη συμπαράσταση που μου προσέφεραν, καθώς και στους, Δρ. Μαρία Παναγοπούλου, Γραμματική Παπαγιάννη, Ευαγγελία Χαριστούδη και Θοδωρή Χατζημητάκο, για την άριστη συνεργασία.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον φίλο και σύντροφό μου Αναστάσιο Παληό για τη συνεχή ενθάρρυνση και την ψυχολογική στήριξη που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια καθώς και την φίλη μου Γεωργία Οικονόμου για την συμβολή της στην συγγραφή του έργου.

Τέλος, θέλω να εκφράσω την ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, Κωνσταντίνο και Ιουλία, καθώς και στον αδερφό μου Ρίζο, για τη συνεχή υποστήριξη και την ηθική συμπαράσταση που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια. Θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για όλες τις θυσίες που έκαναν προκειμένου να μου δώσουν την δυνατότητα να πραγματοποιήσω τις σπουδές μου.

Ευθυμία Παπαρίζου
Ιωάννινα, Μάιος 2013

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	iv
Περιεχόμενα	v
Συντομογραφίες.....	vii

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΣΑΚΧΑΡΑ

1.1.1. Υδατάνθρακες – Γενικά.....	1
1.1.2. Μονοσακχαρίτες	2
1.1.3. Σάκχαρα και περιβάλλον.....	3
1.1.4. Η καύση της βιομάζας.....	7

1.2. Χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης

1.2.1. Ιστορικά στοιχεία της Χρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης	10
1.2.2. Μηχανισμός κατακράτησης στην HILIC.....	11
1.2.3. Μοντέλα κατανομής και επιφανειακής προσρόφησης	15
1.2.4. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της HILIC.....	17
1.2.5. Υδατάνθρακες και υγρή χρωματογραφία.....	20

1.3. ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΣΚΕΔΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD)

1.3.1. Εισαγωγή.....	21
1.3.2. Αρχή Λειτουργίας.....	22
1.3.2.1. Στάδιο Εκνέφωσης.....	23
1.3.2.2. Εξάτμιση Κινητής Φάσης	26
1.3.2.3. Ανίχνευση Σκεδαζόμενης Ακτινοβολίας.....	27
1.3.2.3.1. Γενικά περί σκέδασης φωτός	27
1.3.2.3.2. Απόκριση του ανιχνευτή και ποσοτικοποίηση	29
1.3.3. Εφαρμογές	30

1.4. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....

1.4.1. Εισαγωγή.....	31
1.4.2. Προκατεργασία δειγμάτων αερολύματος.....	32
1.4.2.1. Προετοιμασία δειγμάτων	32
1.4.2.2. Υγρή – στερεή εκχύλιση.....	33
1.4.2.2.1. Εκχύλιση με ανάδευση.....	33
1.4.2.2.2. Εκχύλιση με χρήση υπερήχων	33
1.4.2.3. Εκχύλιση και τεχνολογίες μεμβράνης	34
1.4.2.4. Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης	35
1.4.2.5. Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μαγνητικά νανο-υλικά	35
1.4.2.6. Ο ρόλος της τιτανίας στην κατακράτηση των σακχάρων	37

1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΔΙΑΛΥΤΕΣ-ΥΛΙΚΑ

2.1.1. Αντιδραστήρια - Διαλύτες.....	43
2.1.2. Υλικά.....	44

2.2. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ – ΚΙΝΗΤΕΣ ΦΑΣΕΙΣ	44
2.2.1. Διαλύματα	44
2.2.2. Κινητές φάσεις.....	44
2.3. ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣ.....	48
2.3.1. Σύνθεση μαγνητικού υλικού τιτανίας.....	48
2.3.2. Χαρακτηρισμός του υλικού με FT-IR	49
2.4. ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	50
2.5. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΤΗΛΕΣ	50
2.5.1. Στήλη διόλης - πυριτίας.....	50
2.5.2. Στήλη αμιδο - πυριτίας	51
2.6. ΌΡΓΑΝΑ - ΣΥΣΚΕΥΕΣ	51
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
3.1. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ	57
3.1.1. Επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης στη στατική φάση	57
3.1.1.1. Επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης σε στήλη διόλης – πυριτίας	57
3.1.1.2. Επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης σε στήλη άμιδο – πυριτίας	63
3.1.2. Μυρμηκικό αμμώνιο vs μυρμηκικό οξύ στην κινητή φάση.....	67
3.1.3. Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης.....	71
3.1.4. Επίδραση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης.....	75
3.1.5. Επίδραση των παραμέτρων του ανιχνευτή σκέδασης φωτός, ELSD	77
3.2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	81
3.2.1. Καμπύλες αναφοράς προτύπων διαλυμάτων σακχάρων.....	81
3.3. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΕ ΥΛΙΚΑ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$.....	83
3.3.1. Χαρακτηρισμός των μαγνητικών νανο - υλικών $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$	83
3.3.2. Καθαρισμός δείγματος και προσυγκέντρωση των σακχάρων.....	85
3.3.3. Πειράματα ανάκτησης και ανάλυση πραγματικού δείγματος.....	86
3.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	89
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	91
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	99
SUMMARY	101

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

HILIC	Hydrophilic intreraction liquid chromatography / Υγρή χρωματογραφία υ-δρόφιλης αλληλεπίδρασης
RPLC	Reversed phase liquid chromatography / Υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης
HPLC	High performance liquid chromatography / Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
UHPLC	Ultra high performance liquid chromatography / Υγρή χρωματογραφία εξαιρετικά υψηλής πίεσης
k'	Retention factor / Παράγοντας κατακράτησης
T_f	Tailing factor / Παράγοντας σχετικός με την εμφάνιση «ουράς» μιας κορυφής
R_s	Resolution / Διαχωριστική ικανότητα
ACN	Acetonitile / Ακετονιτρίλιο
DDW	Double-distilled water / Δις απεσταγμένο ύδωρ
RSD	Relative standard deviation / Σχετική τυπική απόκλιση
HETP	Height equivalent to one theoretical plate / Ύψος ισοδύναμο με μια θεωρητική πλάκα
N	Theoretical plates / Αριθμός θεωρητικών πλακών
DAD	Diode array detector / Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων
UV / Vis	Ultraviolet / Visible / Υπεριώδες / Ορατό
MS	Mass spectrometry / Φασματομετρία μαζών
ESI	Electron spray ionization / Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό
ELSD	Evaporative light scattering detector / Ανιχνευτής σκεδασμού φωτός
EtOH	Ethanol / Αιθανόλη

IPA	Isopropanol / Ισοπροπανόλη
PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbons / Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες
PBAPs	Primary biological aerosol particles / Πρωτογενή βιολογικά ατμοσφαιρικά σωματίδια
PDMS	Poly-dimethylsiloxane / Πολυ-διμεθυλοσιλοξάνιο
DVB	Divinylbenzene / Διβινυλοβενζόλιο
PA	Polyacrylamide / Πολυακρυλαμίδιο
PM	Particulate matter / Αιωρούμενα σωματίδια
NPs	Nanoparticles / Νανοσωματίδια
SPE	Solid phase extraction / Εκχύλιση στερεάς φάσης
SPME	Solid phase microextraction / Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης
TEOS	Tetraethoxy silane / Τετρααιθοξυ σιλάνιο
v/v	Volume per volume / Όγκος προς όγκο
w/w	Weight per weight / Βάρος κατά βάρος

ΟΡΙΣΜΟΙ-ΤΥΠΟΙ

Παράγοντας κατακράτησης, k' ,

$$k' = \frac{t_R - t_o}{t_o},$$

t_R : χρόνος κατακράτησης,

t_o : νεκρός χρόνος

Διαχωριστική ικανότητα, R_s ,

$$R_s = 2x \frac{t_R - t_{Rp}}{W + W_p},$$

W : εύρος κορυφής επί της γραμμής βάσης, W_p : εύρος κορυφής επί της γραμμής βάσης της προηγούμενης ένωσης

Παράγοντας εμφάνισης ουράς, T_f ,

$$T_f = \frac{W_{0,05}}{2\chi a_{0,05}},$$

$W_{0,05}$: εύρος κορυφής μετρούμενο στο 5% του ύψους, $a_{0,05}$: εύρος του πρώτου μισού του τμήματος της κορυφής μετρούμενο στο 5% του ύψους

Αριθμός θεωρητικών πλακών, N ,

$$N = 16x \left(\frac{t_R}{W} \right)^2,$$

t_R : χρόνος κατακράτησης, W : εύρος κορυφής επί της γραμμής βάσης

Ύψος ισοδύναμο με θεωρητική πλάκα, $HETP$,

$$HETP = \frac{Lx1000}{N} (\mu m),$$

L : μήκος στήλης, N : αριθμός θεωρητικών πλακών



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

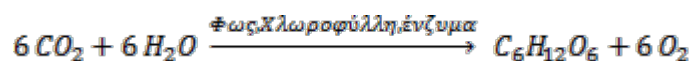
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΣΑΚΧΑΡΑ

1.1.1. Υδατάνθρακες - Γενικά

Το άμυλο (starch) στους φυτικούς οργανισμούς, η κυτταρίνη (κελουλόζη, cellulose) στα διάφορα είδη ξύλου, το χαρτί, το βαμβάκι και διάφορα άλλα προϊόντα φυτικής προέλευσης, είναι καθαροί υδατάνθρακες, ενώ τροποποιημένα μόρια υδατανθράκων βρίσκονται στα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων (DNA, RNA) και σε άλλες ενώσεις βιολογικής σημασίας. Μαζί με τις πρωτεΐνες και τα λίπη, οι υδατάνθρακες αποτελούν βασικά συστατικά στους ζωντανούς οργανισμούς με μεγάλη βιολογική και ενεργειακή σημασία.

Οι υδατάνθρακες βιοσυντίθενται από τα φυτά μέσω της φωτοσύνθεσης, όπου το ηλιακό φως προσφέρει την απαιτούμενη ενέργεια και μετατρέπει το ατμοσφαιρικό διοξείδιο του άνθρακα σε γλυκόζη. Η συνολική αντίδραση μπορεί να γραφεί ως:



Τα μόρια της γλυκόζης που σχηματίζονται με τον τρόπο αυτό αποθηκεύονται στα φυτά στην πολυμερισμένη μορφή της, ως άμυλο ή ως κυτταρίνη. Οι επιστήμονες έχουν υπολογίσει ότι το 50% του καθαρού βάρους της βιομάζας στον πλανήτη Γη (σύνολο ζώων και φυτών) αποτελείται από πολυμερή της γλυκόζης. Εκτιμάται δε, ότι ετησίως παράγονται 100 δισεκατομμύρια τόνοι υδατανθράκων με τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης.

Η κατανάλωση υδατανθράκων μέσω των τροφών και στη συνέχεια ο μεταβολισμός τους αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας κάθε ζωντανού οργανισμού. Επιπλέον, ο οργανισμός μπορεί να αποθηκεύσει τους υδατάνθρακες στη μορφή γλυκογόνου (glycogen), ως ενεργειακό απόθεμα για μεταγενέστερη χρήση ή για να καλύψει άμεσες ανάγκες. Τα μηρυκαστικά ζώα (αγελάδες, κασίκες, κ.λπ.) διαθέτουν στο στομάχι τους μικροοργανισμούς, που τους επιτρέπουν τη διάσπαση της κυτταρίνης σε γλυκόζη. Η κυτταρίνη είναι ο πολυσακχαρίτης που βρίσκεται συχνότερα στην φύση, αποτελώντας το 1/3 περίπου της μάζας των ετήσιων φυτών και περίπου το 50% του κυτταρικού τοιχώματος του ξύλου. Έτσι, κυτταρίνη και ημικυτταρίνη, αποτελούν την κύρια και σημαντικότερη πηγή μονο- και δι-σακχαριτών που παράγονται κατά την καύση της βιομάζας.

Η ονομασία *υδατάνθρακες* (carbohydrates) προέρχεται ιστορικά από το γεγονός ότι η γλυκόζη (άλλες κοινές ονομασίες: *σταφυλοσάκχαρο*, *δεξτρόζη*), ο πρώτος απλός υδατάνθρακας που απομονώθηκε σε καθαρή μορφή, έχει μοριακό τύπο $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ και αρχικά θεωρήθηκε ως ένα είδος υδρίτη του άνθρακα (εφυδατωμένος άνθρακας), δηλαδή

$C_6(H_2O)_6$. Αν και η άποψη αυτή σύντομα εγκαταλείφθηκε, η ονομασία παρέμεινε. Ο όρος υδατάνθρακες σήμερα περιλαμβάνει μια ευρύτατη ομάδα πολυ-υδροξυλιωμένων αλδεϋδών και κετονών που κοινώς τα ονομάζουμε σάκχαρα. Στη Χημεία, ο όρος *γλυκίδια* (*glucides*), τον οποίο προσπάθησαν να καθιερώσουν οι Γάλλοι, αποτελεί συνώνυμη ονομασία των υδατανθράκων και χρησιμοποιείται και σήμερα κυρίως σε γαλλική σχετική βιβλιογραφία. Τα γλυκίδια διακρίνονται σε δύο μεγάλες ομάδες τις *όζες* και τους *οζίτες*, ή *ολοζίδες*, ή *οζίδια*. Οι πρώτες ταυτίζονται με τους μονοσακχαρίτες, και περιλαμβάνουν τις αλδόζες και τις κετόζες, ενώ οι δεύτερες είναι συνώνυμες με τους γλυκοζίτες (υδατάνθρακες που μπορούν να υδρολυθούν), οι οποίοι διακρίνονται σε τρεις επιμέρους κατηγορίες τους *ολοζίτες*, τους *πολυοζίτες* ή *πολυολοζίτες* και τους *ετεροζίτες*.

1.1.2. Μονοσακχαρίτες

Οι μονοσακχαρίτες είναι οι πιο απλοί υδατάνθρακες με την έννοια ότι δεν είναι δυνατό να υδρολυθούν σε μικρότερους υδατάνθρακες. Είναι αλδεϋδες ή κετόνες με δύο ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου. Παράγονται στα πράσινα μέρη των φυτών κατά τη φωτοσύνθεση και αποτελούν το δομικό λίθο των δι- και πολύ-σακχαριτών. Οι υδατάνθρακες αυτοί, γενικά έχουν χρώμα λευκό, είναι στερεοί και κρυσταλλικοί και συνήθως υδατοδιαλυτοί.

Η αλυσίδα του άνθρακα που σχηματίζουν τα σάκχαρα καθώς και η βασική δομή τους διαφέρουν. Μερικοί, δηλαδή, μονοσακχαρίτες περιέχουν τρία μόνο άτομα άνθρακα, καλούμενοι και "*τριόζες*" ενώ άλλοι περιέχουν πέντε άτομα άνθρακα, καλούμενοι και "*πεντόζες*". Αλλά εκείνοι με έξι άτομα άνθρακα ("*εξόζες*"), όπως η γλυκόζη, θεωρούνται πιο σημαντικοί επειδή έτσι μπορούν να ενωθούν με αντίδραση συμπύκνωσης (με απώλεια H_2O) προκειμένου να σχηματίσουν τους λεγόμενους δισακχαρίτες, αλλά και τους πολυσακχαρίτες. Ειδικότερα οι τριόζες, αποτελούν τα ενδιάμεσα προϊόντα της φωτοσύνθεσης και της κυτταρικής αναπνοής. Οι πεντόζες, όπως η ριβόζη και η δεσοξυριβόζη αποτελούν τα συστατικά των νουκλεοτιδίων, ενώ οι εξόζες, όπως η γλυκόζη αποτελούν πηγές ενέργειας και συστατικά των δισακχαριτών.

Η *μαννοζάνη* και η *λεβογλυκοζάνη* είναι ισομερή σάκχαρα που ανήκουν στην κατηγορία των άνυδρο-σακχαριτών και παράγονται σε μεγάλο βαθμό κατά την πυρόλυση της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης [Dixon, *et al.*, 2006]. Για το λόγο αυτό, σε πολλές μελέτες χρησιμοποιούνται ως ιχνηθέτες για την καύση της βιομάζας. Η *ξυλιτόλη*, για εμπορική χρήση, προέρχεται από φυσικές πηγές, όπως κορμούς δένδρων της σημύδας (ξύλο, από εκεί προέρχεται και το όνομά της, ξυλιτόλη). Η *ξυλιτόλη* και το ισομερές της η *αραβιτόλη*

περιέχουν πέντε άτομα άνθρακα και παράγονται κατά την καύση της κυτταρίνης (ξύλου). Η *μαννόζη* βρίσκεται σπάνια σε ελεύθερη κατάσταση. Περισσότερο, βρίσκεται ενωμένη σε γλυκοζίτες ή σε πολυσακχαρίτες ημικυτταρινών. Τέλος, η *μαννιτόλη* είναι μια πολυαλκοόλη που βρίσκεται συχνά σε διάφορα φυσικά προϊόντα και κυρίως σε δέντρα. Είναι ένα ισομερές της σορβιτόλης και σήμερα παράγεται από την υδρογόνωση της γλυκόζης. Όλα τα υπό μελέτη σάκχαρα αποτελούν δομικά συστατικά της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης και παράγονται στην ατμόσφαιρα κατά την καύση της βιομάζας.

1.1.3. Σάκχαρα και περιβάλλον

Ατμοσφαιρικά αερολύματα (aerosols) είναι όλα τα σταθερά αιωρήματα στερεών ή υγρών σωματιδίων ή και των δυο στον αέρα. Παρόλο που σύμφωνα με τον ορισμό τους τα ατμοσφαιρικά αερολύματα είναι ο συνδυασμός όλων των συμπυκνωμένων συστατικών που είναι παρόντα και αιωρούνται στην ατμόσφαιρα, όπως επίσης και ο αέρας στον οποίο περιέχονται αυτά, σε πολλές περιπτώσεις αναφερόμαστε μόνο στο σωματιδιακό τμήμα αυτών. Εκπεμπόμενα απευθείας ως σωματίδια στην ατμόσφαιρα (πρωτογενή ατμοσφαιρικά σωματίδια ή πρωτογενή αερολύματα) ή δημιουργούμενα στην ατμόσφαιρα μέσω διαδικασιών μετατροπής μορίων αερίων σε σωματίδια (δευτερογενή ατμοσφαιρικά σωματίδια ή δευτερογενή αερολύματα), τα ατμοσφαιρικά αερολύματα γενικά είναι σωματίδια που η διάμετρός τους κυμαίνεται από λίγα νανόμετρα (nm) μέχρι 10 μικρόμετρα (μm).

Τα σάκχαρα είναι σημαντικά συστατικά των αερολυμάτων του περιβάλλοντος. Περίπου το 13-26% της συνολικής μάζας των ενώσεων που προσδιορίζονται στα ηπειρωτικά αερολύματα είναι σάκχαρα ενώ ο αριθμός αυτός μπορεί να φθάσει το 63% στα ωκεάνια αερολύματα. Τα σάκχαρα στα αερολύματα έχουν προταθεί ως ιχνηθέτες που είναι χαρακτηριστικοί για τις πηγές τους και τη μεταφορά βιολογικά σημαντικών οργανικών υλικών στο φυσικό περιβάλλον. Η οργανική ύλη των σωματιδίων της ατμόσφαιρας προέρχεται από τέσσερις κύριες πηγές και αναμειγνύονται ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι πηγές αυτές των σωματιδίων είναι: (1) τα φυσικά βιογενή κατάλοιπα (natural biogenic detritus) (π.χ. φυτικό κερί, μικρόβια, γύρη, κ.λπ.), (2) οι ανθρωπογενείς εκπομπές (πετρελαίου, αιθάλης), (3) η οργανική ύλη του εδάφους, και (4) η καύση της βιομάζας (φυσική και ανθρωπογενής).

Οι βιογενείς βιοδείκτες (biogenic biomarkers) στα ατμοσφαιρικά δείγματα αποτελούνται από ομόλογες σειρές των αλκανοϊκών οξέων, αλκοολών και αλκανίων. Προέρχονται από φυτικά κεριά και λιπίδια φυτών, με μικρότερες ποσότητες άλλων οξυγονωμένων ομόλογων ειδών, όπως αλκανοδιοϊκά οξέα και αλκαν-2-όνες. Άλλοι πρωτογενείς βιογενείς

βιοδείκτες που παρατηρήθηκαν σε ατμοσφαιρικά δείγματα περιλαμβάνουν στερόλες (χοληστερόλη, καμπεστερόλη και σιτοστερόλη), τριτερπενοειδή (π.χ. α- και β-αμυρόνη), διτερπενοειδή (π.χ., αφυδροαβιετικό οξύ) και σε μεγάλο βαθμό σάκχαρα (μονο-και δι- σακχαρίτες).

Τα σάκχαρα είναι πανταχού παρόντα στο περιβάλλον αφού αντιπροσωπεύουν την κύρια μορφή του φωτοσυνθετικά αφομοιωμένου διοξειδίου του άνθρακα στη βιόσφαιρα. Περιλαμβάνουν έως και 75% των φυτικών ιστών και των δομικών μονάδων των πολυσακχαριτών, όπως κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και πηκτίνη. Μελέτες έχουν εντοπίσει σάκχαρα σε εκπομπές από την καύση βιομάζας, από την ατμοσφαιρική παράσυρση (atmospheric entrainment) του εδάφους και των συναφών ζώντων οργανισμών, και πιο πρόσφατα από τα πρωτογενή βιολογικά ατμοσφαιρικά σωματίδια (primary biological aerosol particles, PBAPs) [Medeiros, *et al.*, 2006].

Συγκεκριμένα, τα αερολύματα από την καύση της βιομάζας περιλαμβάνουν ανυδρο-σακχαρίτες (λεβογλυκοζάνη, μαννοζάνη και γαλακτοζάνη) που παράγονται από την καύση και την πυρόλυση κυτταρίνης και ημικυτταρίνης, και ενδεχομένως, πολυόλες σακχάρων από θερμική αποδόμηση κατά την καύση [Dixon, *et al.*, 2006]. Το έδαφος και οι ζώντες οργανισμοί συνεισφέρουν στα περιβαλλοντικά αερολύματα μέσω επαναιώρησης από αιολική διάβρωση ή γεωργικές πρακτικές [Wan, *et al.*, 2006]. Τα σάκχαρα που προσμετρούνται στις εκπομπές από την κατηγορία αυτή περιλαμβάνουν μια ποικιλία από μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες, και σακχαρικές πολυόλες, ανάμεσα στις οποίες η γλυκόζη, η σακχαρόζη και η τρεαλόζη που προτάθηκαν ως ενώσεις δείκτες σε μελέτη των εδαφών [Jia, *et al.*, 2010b].

Τα PBAPs προέρχονται από βιολογικούς παράγοντες όπως είναι τα σπόρια, η γύρη, οι μύκητες, τα φύκη, τα πρωτόζωα, τα βακτήρια, οι ιοί, τα φυτά και τα ζώα. Εισέρχονται στο ατμοσφαιρικό περιβάλλον μέσω άμεσης απόθεσης, ενώ μια σειρά από σάκχαρα προέρχονται από PBAPs [Jia, *et al.*, 2010a, Jia, *et al.*, 2011]. Ειδικότερα, η μαννιτόλη και η αραβιτόλη έχουν προταθεί ως ιχνηθέτες για αερομεταφερόμενα σπόρια των μυκήτων [Bauer, *et al.*, 2008]. Έτσι, η συγκέντρωση της κυτταρίνης που βρίσκεται στα ατμοσφαιρικά σωματίδια συνδέεται με τη σύνθεση των μιγμάτων σακχάρων στα ατμοσφαιρικά αιωρούμενα σωματίδια (PM) με το βιόκοσμο του εδάφους. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για τη συμμετοχή των PBAPs στα ατμοσφαιρικά οργανικά σωματίδια. Η συνεισφορά των τριών αυτών πηγών (καύση βιομάζας, ατμοσφαιρική παράσυρση του εδάφους και των συναφών ζώντων οργανισμών και PBAPs) έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν σημαντικές πηγές σακχάρων στα περιβάλλοντα ατμοσφαιρικά σωματίδια [Jia, *et al.*, 2011]. Στην ατμόσφαιρα, τα σάκχαρα αποτελούνται από τρεις κύριες ομάδες: (1) πρωτογενή σάκχαρα που αποτελούνται από μόνο- και δι- σακχαρίτες, (2) σακχαρικές πολυόλες

(ανηγμένα σάκχαρα), και (3) παράγωγα ανυδροσακχαριτών κυρίως λεβογλυκοζάνης (1,6-ανυδρο-β-D-γλυκοπυρανόζης) [Jia, *et al.*, 2010b].

Τα κυρίαρχα πρωτογενή σάκχαρα στην ατμόσφαιρα αποτελούνται από α- και β-γλυκόζη, σακχαρόζη και μυκόζη (τρεαλόζη), με διάφορα άλλα συστατικά (π.χ., ερυθριτόλη, ξυλιτόλη, αραβιτόλη, μαννόζη, μαννιτόλη και ινοσιτόλες). Οι πηγές των ουσιών αυτών είναι πολλές και περιλαμβάνουν μικροοργανισμούς, φυτά και ζώα. Η γλυκόζη είναι ο πιο κοινός μονοσακχαρίτης που βρίσκεται στους ιστούς των φυτών και αποτελεί σημαντική πηγή άνθρακα για τους μικροοργανισμούς του εδάφους, όπως μύκητες και βακτήρια. Κάποιοι οργανισμοί συνδυάζουν δύο βασικούς μονοσακχαρίτες σε δισακχαρίτη για τη μεταφορά των σακχάρων στο εσωτερικό τους (π.χ. σακχαρόζη στα φυτά), αλλά και για τη χρήση τους ως αποθεματικού ενέργειας ή ως προστατευτικού εργαλείου ενάντια στο στρες (μυκόζη σε βακτήρια, μαγιά (μονοκύτταροι μύκητες), και μερικά ανώτερα φυτά καθώς και έντομα) [Caseiro, *et al.*, 2007]. Το CO₂ που βρίσκεται στα φύλλα μετακινείται, αρχικά, στο φλοιό των δέντρων κυρίως ως σακχαρόζη (δισακχαρίτης γλυκόζη + φρουκτόζη) και φτάνει στα κύτταρα της ρίζας σε αυτή τη μορφή. Ωστόσο, στους συμβιωτικούς ιστούς των μυκήτων (μύκητες μυκόριζας), η σακχαρόζη αντικαθίσταται από μυκόζη (γλυκόζη + γλυκόζη) ως ο πιο κοινός δισακχαρίτης. Η μυκόζη είναι παρούσα σε μια μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών (μύκητες, βακτήρια, ζύμες), σε μερικά ανώτερα φυτά και ασπόνδυλα, όπου μπορεί να χρησιμεύσει ως ενεργειακό απόθεμα και ως προστασία κατά του στρες.

Οι σακχαρικές πολυόλες παράγονται σε μεγάλες ποσότητες από πολλούς μύκητες (συμπεριλαμβανομένων των λειχήνων) και βακτήρια, που ανάγουν τους μονοσακχαρίτες σε αλδιόλες, ενώ πολλές λειτουργίες έχουν προταθεί για αυτές τις ενώσεις, όπως η αποθήκευση ή μεταφορά των υδατανθράκων και η ενδοκυτταρική οσμωρύθμιση διαλυμένων ουσιών. Οι πολυόλες είναι επίσης οι κύριοι ευδιάλυτοι υδατάνθρακες στις λειχήνες ενώ συχνά βρίσκονται στο φλοιό των δέντρων, στα κλαδιά και στα φύλλα. Τα βακτήρια μπορούν επίσης να σχηματίσουν και να συσσωρεύσουν πολυόλες (π.χ. σορβιτόλη), προκειμένου να ξεπεράσουν την οσμωτική πίεση.

Τα φυτά πολυμερίζουν τους μονοσακχαρίτες σε πολυσακχαρίτες (π.χ. κυτταρίνη, ένα πολυμερές της γλυκόζης, και ημικυτταρίνη, τα πολυμερή των διαφόρων μονοσακχαριτών) για την ανάπτυξή τους. Η λεβογλυκοζάνη και λιγότερο η μαννοζάνη, η γαλακτοζάνη και η 1,6-ανυδρο-β-D-γλυκοφουρανόζη (ισομερή της λεβογλυκοζάνης) είναι τα κύρια προϊόντα θερμικής μεταβολής που παράγονται κατά την καύση της βιομάζας (κυρίως ξύλου), κυτταρίνης και ημικυτταρίνης, και σε μικρότερο βαθμό από την καύση τσιγάρου και, ως εκ τούτου, είναι βασικοί ιχνηθέτες για τα σωματίδια αιθάλης στην ατμόσφαιρα [Bari, *et al.*, 2010, Dixon, *et al.*, 2006, Dye, *et al.*, 2005]. Η λεβογλυκοζάνη και άλλοι ανυδροσακχαρίτες

που παράγονται κατά την καύση της βιομάζας είναι ιδιαίτερα σταθεροί στις διάφορες ατμοσφαιρικές συνθήκες και έχουν βρεθεί στην ατμόσφαιρα ακόμη και πάνω από τον Ατλαντικό ωκεανό, που βεβαιώνουν τη σταθερότητα τους και κατά τη διάρκεια της μεταφοράς σε μεγάλες αποστάσεις [Medeiros, *et al.*, 2006, Niemi, *et al.*, 2009, Schkolnik, *et al.*, 2005, Schkolnik, *et al.*, 2006, Simoneit, *et al.*, 2000, Simoneit, *et al.*, 1999].

Μια σημαντική πηγή τέτοιων σωματιδίων στις αστικές περιοχές κατά τους χειμερινούς μήνες είναι η καύση του ξύλου σε οικιακούς φούρνους και τζάκια, που συμβάλλει περίπου κατά 10-30% στην ατμοσφαιρική επιβάρυνση με αιωρούμενα σωματίδια. Τα εκχυλίσματα των σωματιδίων αιθάλης από την καύση του ξύλου, στα όρια του εισπνεύσιμου μεγέθους, έχει αποδειχθεί ότι είναι μεταλλαξιογόνα αυξάνοντας έτσι τη σημασία τους ως παράγοντα που μπορεί να επηρεάσει την ανθρώπινη υγεία. Τα αέρια φάσης υποπροϊόντα καύσης, όπως NO_x , HCN , CH_3CN , CH_4 και CH_3Cl έχουν χρησιμοποιηθεί για να αξιολογήσουν τη συμβολή των εκπομπών από καύση βιομάζας στα επίπεδα του περιβάλλοντος από τα αιωρούμενα σωματίδια, αλλά κανένα από αυτά τα αέρια είδη δεν είναι μοναδικό για την καύση της βιομάζας και επιπλέον, το CH_3Cl χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία. Άλλοι ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει μη μεταλλικό κάλιο ως ιχνηθέτη για τον καπνό από ξύλο, αλλά υπάρχουν και άλλες πηγές καλίου, όπως από το μαγείρεμα κρέατος και την αποτέφρωση απορριμμάτων. Οι μεταβλητές όμως συγκεντρώσεις του καλίου στα σωματίδια καπνού και σε σωματίδια εδάφους τον καθιστούν ακατάλληλο ως ιχνηθέτη. Άλλοι ερευνητές έχουν επικεντρωθεί στους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs) ως δυνητικούς ιχνηθέτες για τον καπνό, αλλά αυτοί δεν είναι μοναδικοί για την καύση ξύλου. Η ρητίνη έχει, επίσης, προταθεί ως ειδικός ιχνηθέτης για την καύση από ξύλο, αλλά υπάρχει μόνο στον καπνό από κωνοφόρα (γυμνόσπερμα) και είναι μια ημιπτητική οργανική ένωση με σχετικά υψηλή τάση ατμών, καθιστώντας την ποσοτικοποίησή της δύσκολη. Άλλες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει ^{14}C ως ιχνηθέτη, αλλά υπάρχουν πολλές πηγές αυτού του άνθρακα παράλληλα με την καύση ξύλου, και η τεχνική είναι σχετικά δαπανηρή [Nolte, *et al.*, 2001].

Τα σάκχαρα, όμως, υπάρχουν ευρέως στην ατμόσφαιρα των αστικών, αγροτικών και απομακρυσμένων περιοχών. Ως εκ τούτου, είναι δυνητικά ισχυρά εργαλεία για τη μελέτη των οργανικών πηγών του διοξειδίου του άνθρακα και της πορείας μεταφοράς του οργανικού άνθρακα στην ατμόσφαιρα. Επιπλέον, τα σάκχαρα και άλλα υδατοδιαλυτά συστατικά πιστεύεται ότι ρυθμίζουν την υγροσκοπικότητα της ατμόσφαιρας και, κατά συνέπεια, διαδραματίζουν, εν δυνάμει, σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κλίματος [Chan, *et al.*, 2005, Ma, *et al.*, 2009].

Μια μελέτη, λοιπόν, για τη χημική σύνθεση και τις πηγές των σακχάρων, θα ήταν σημαντική για τη διερεύνηση της προέλευσης των υδατοδιαλυτών οργανικών αερολυμάτων και τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις.

1.1.4. Η καύση της βιομάζας

Η ρύπανση από οργανικές ουσίες αερολύματος προκάλεσε ανέκαθεν το ενδιαφέρον των επιστημόνων, λόγω των επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία (π.χ., άσθμα, εμφύσημα), με τις σχετικά τοξικές οργανικές ενώσεις. Η οργανική ύλη των αερολυμάτων αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό μεμονωμένων ενώσεων και είναι ευρέως διαδεδομένη στο περιβάλλον.

Η καύση είναι μια σημαντική πρωτογενής πηγή πολλών ανιχνεύσιμων οργανικών ουσιών που μειώνουν την ορατότητα και απορροφούν την ακτινοβολία. Η καύση της βιομάζας, ελεγχόμενη ή μη, έχει αναδειχθεί ένα παγκόσμιο πρόβλημα. Η καύση της βιομάζας σε δασικές πυρκαγιές είναι ένα φυσικό φαινόμενο στον πλανήτη. Ωστόσο, σήμερα ο ρυθμός των παγκόσμιων πυρκαγιών έχει αυξηθεί ραγδαία εξαιτίας των ανθρωπογενών παρεμβάσεων. Στην Πορτογαλία, εκτιμάται ότι, κατά την τελευταία δεκαετία, πυρκαγιές έχουν καταστρέψει περίπου 110.000 εκτάρια ανά έτος δάσους, που αντιστοιχεί σε ετήσια απώλεια βιομάζας περίπου 400.000 τόνων. Η συνολική έκταση που κάηκε αντιπροσώπευε σχεδόν πέντε φορές το μέσο όρο των τελευταίων δύο δεκαετιών [Pio, *et al.*, 2008].

Οι επιπτώσεις των ατμοσφαιρικών σωματιδίων στην παγκόσμια κλιματική αλλαγή είναι πλέον υψίστης σημασίας. Η καύση της βιομάζας είναι μια σημαντική παγκόσμια πηγή αιωρούμενων σωματιδίων (PM) στην ατμόσφαιρα, με σημαντικές επιπτώσεις στην ποιότητα του αέρα, την αλλαγή του μικροκλίματος, την ορατότητα, τα οικοσυστήματα, στην ανθρώπινη υγεία και το παγκόσμιο κλίμα [Dye, *et al.*, 2005]. Οι οργανικές ενώσεις των ατμοσφαιρικών σωματιδίων σε γενικές γραμμές είναι συγκεκριμένοι ιχνηθέτες για τις πηγές τους από τη χρήση ορυκτών καυσίμων (εκπομπές από την κίνηση των οχημάτων, η καύση του άνθρακα), την καύση βιομάζας (πυρκαγιές, θέρμανση, κλπ.) και τις ανθρωπογενείς εκπομπές (βιομηχανία, μαγείρεμα, κλπ) [Pio, *et al.*, 2008, Schkolnik, *et al.*, 2005, Simoneit, 2002].

Βασικά προϊόντα από την καύση της βιομάζας είναι παράγωγα μονοσακχαριτών από την αποδόμηση της κυτταρίνης, φαινολικών από την αποδόμηση της λιγνίνης, που συνοδεύεται από γενικά μικρότερες ποσότητες αλειφατικών και οξυγονούχων ενώσεων και τερπενοειδή από φυτικά κεριά, ρητίνες, γόμες, και άλλα βιοπολυμερή. Η καύση του

άνθρακα (κυρίως λιγνίτης και τύρφη) εκλύει επίσης σωματίδια με χαρακτηριστικές οργανικές ενώσεις ιχνηθετών [Fabbri, *et al.*, 2009].

Οι εκπομπές από την καύση οποιουδήποτε τύπου καυσίμου εξαρτώνται άμεσα από τη χημική σύνθεση του καυσίμου και τις συνθήκες καύσης. Διαφορετικά είδη δέντρων αναπτύσσουν διαφορετικά ξυλώδη συστατικά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και κατά κανόνα, κάθε ξύλο αποτελείται από διάφορες μορφές κυτταρίνης και λιγνινών. Η κυτταρίνη παρέχει ένα ινώδες πλέγμα, που ενισχύεται από πολυμερή λιγνίνης (~30% του ξυλώδους ιστού) και είναι κυρίως υπεύθυνη για τη δομική αντοχή του ξύλου. Το μόριο της κυτταρίνης είναι ένα μακράς αλυσίδας, γραμμικό πολυμερές που αποτελείται από 7.000-12.000 μονομερή D-γλυκόζης και μεμονωμένα μόρια κυτταρίνης. Σε αντίθεση, η ημικυτταρίνη είναι ένα μείγμα από πολυσακχαρίτες που προέρχονται κυρίως από γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη και αραβινόζη. Τα μόρια της ημικυτταρίνης αποτελούνται από μόνο περίπου 100-200 μονομερή σακχάρων και η σύνθεσή τους διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών ειδών δέντρων. Τα βιοπολυμερή της λιγνίνης προέρχονται από τις π-κουμαρόλη, κονιφερόλη και σιναπόλη και περιέχουν κυρίως ανισόλη, βανιλλόλη και συρινγκόλη. Ταννίνες, τερπένια και άλλες ενώσεις βρίσκονται, επίσης, στον ξυλώδη ιστό και τον καθιστούν μια πολύπλοκη ουσία.

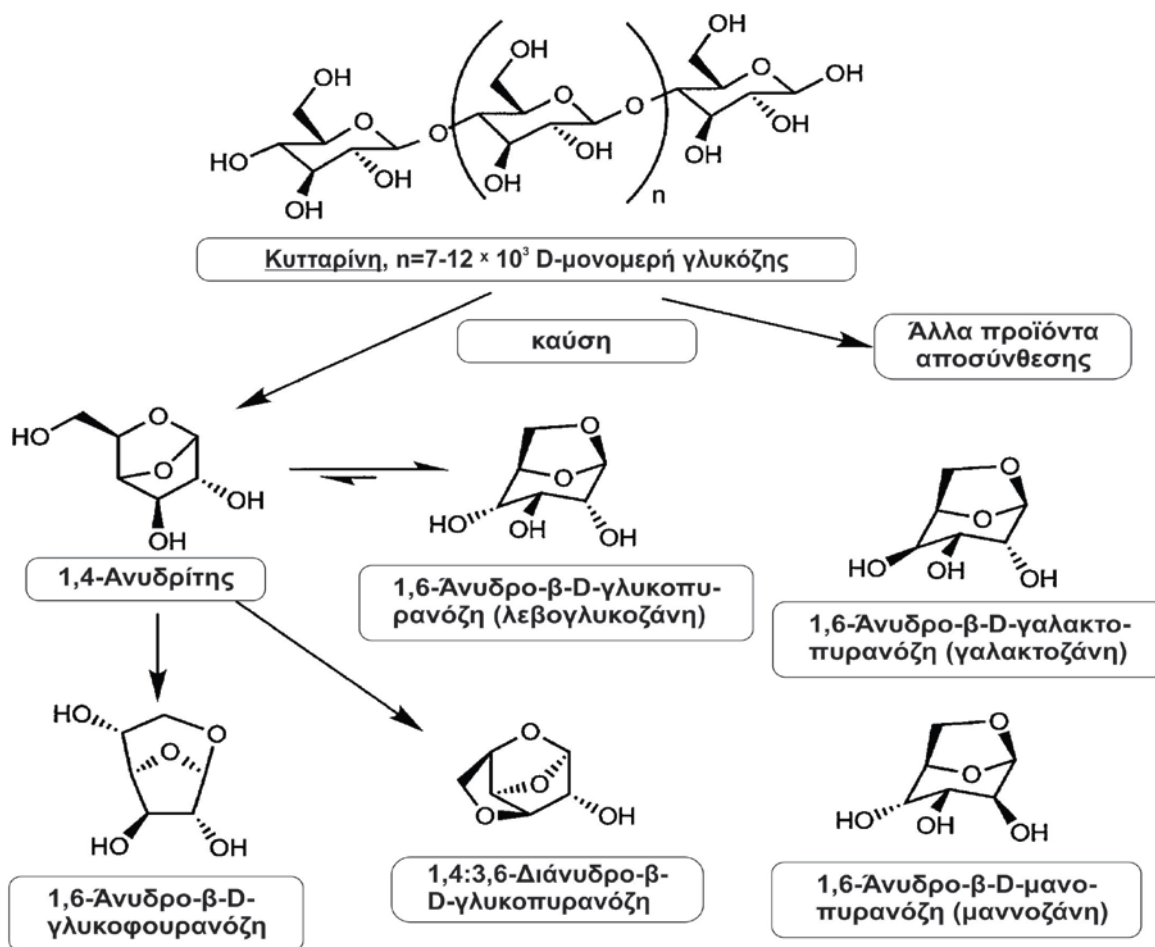
Η περιεκτικότητα του ξύλου σε υγρασία ποικίλλει σημαντικά και το βέλτιστο περιεχόμενο, όσον αφορά τη μείωση των εκπομπών σωματιδίων κατά τη διάρκεια της καύσης ξύλου είναι μεταξύ 20 και 30%. Αν η περιεκτικότητα σε υγρασία είναι πολύ υψηλή, ένα αξιόλογο ποσό ενέργειας είναι απαραίτητο για την εξάτμιση του νερού, μειώνοντας την θερμοκρασία καύσης του ξύλου καθώς και μειώνεται η απόδοση της καύσης, η οποία με τη σειρά της αυξάνει την δημιουργία καπνού. Αυτό είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται συχνά σε φωτιές και πυρκαγιές. Από την άλλη πλευρά, το ξύλο με χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία καίγεται πιο γρήγορα προκαλώντας τελικά συνθήκες περιορισμένες σε οξυγόνο που οδηγούν σε ατελή καύση με αυξημένο σχηματισμό σωματιδίων καπνού.

Η διαδικασία της καύσης ξύλου μπορεί να συνοψισθεί ως εξής. Όταν το ξύλο θερμαίνεται, τα συστατικά του αρχίζουν και υδρολύονται, οξειδώνονται, αφυδατώνονται και πυρολύονται, με την αύξηση της θερμοκρασίας, σχηματίζοντας εύφλεκτες πτητικές ουσίες πίσσας. Κατά τη θερμοκρασία ανάφλεξης των πτητικών ουσιών και πίσσας, λαμβάνουν χώρα εξώθερμες αντιδράσεις γνωστές ως αντιδράσεις καύσης. Κατά τη διάρκεια της υποβόσκουσας διαδικασίας, αρκετή θερμότητα παράγεται για να διαδοθεί η απανθράκωση της διαδικασίας καθώς και η απελευθέρωση των πρόσθετων πτητικών προϊόντων αποσύνθεσης του ξύλου.

Η τύχη της κυτταρίνης κατά την καύση έχει μελετηθεί εκτενώς. Η κυτταρίνη αποσυντίθεται κατά τη θέρμανση ή την έκθεσή της σε πηγή ανάφλεξης από δύο εναλλακτικές

διαδρομές. Η πρώτη, η οποία κυριαρχεί σε θερμοκρασίες <300 °C, περιλαμβάνει αποπολυμερισμό, απομάκρυνση του νερού, κατακερματισμό και οξειδωση που οδηγεί τελικά σε ολοσχερή καύση. Το δεύτερο μονοπάτι γίνεται σε θερμοκρασίες >300 °C και συνεπάγεται αποικοδόμηση των δεσμών, σχάση και ασύμμετρες αντιδράσεις που παράγουν πισσώδη άνυδρο σάκχαρα και πτητικά προϊόντα. Το δεύτερο μονοπάτι είναι αυτό που οδηγεί στην πηγή συγκεκριμένων μοριακών ιχνηθετών, δηλαδή κυρίως τον 1,6-ανυδρίτη της γλυκόζης που ονομάζεται λεβογλυκοζάνη, το ισομερές φουρανόζη και ένα διανυδρίδιο (Εικόνα 1.1). Η λεβογλυκοζάνη θεωρείται ότι είναι εξολοκλήρου μέρος των σωματιδίων του καπνού από καύσεις ξύλου και έχει ποσοστό εκπομπών 2-18 mg/min από ένα τυπικό φούρνο με ξύλα. Είναι σταθερή στην ατμόσφαιρα και δεν δείχνει μεταβολή πάνω από 8 ώρες έκθεσης σε συνθήκες περιβάλλοντος και στο ηλιακό φως. Η λεβογλυκοζάνη έχει επίσης αναφερθεί ότι είναι παρούσα σε προϊόντα πυρόλυσης της τύρφης, λιγνίνης και ξύλου. Παρεμπιπτόντως, άλλα πολυμερή υδατανθράκων (π.χ. άμυλο) παράγουν επίσης λεβογλυκοζάνη από θερμική μεταβολή. Ωστόσο, οι θερμοκρασίες που επιτυγχάνονται στο μαγείρεμα ή το ψήσιμο δεν είναι επαρκείς για να πυρολυθούν οι υδατάνθρακες σε λεβογλυκοζάνη και συνεπώς οι αντιδράσεις που συμβαίνουν σε χαμηλότερη θερμοκρασία δεν αποτελούν σημαντική πηγή [Schkolnik, *et al.*, 2006, Simoneit, 2002, Simoneit, *et al.*, 1999].

Σε αναγνώριση, λοιπόν, του ρόλου των σακχάρων που βρίσκονται στην ατμόσφαιρα ως δείκτες των κύριων πηγών αερολυμάτων, η μελέτη αυτή έγινε για να χαρακτηρίσει τη σύνθεση του σακχαρικού περιεχομένου στο περιβάλλον. Έτσι, κρίθηκε αναγκαίο να διακρίνουμε ποιοτικά και ποσοτικά τα ατμοσφαιρικά σωματίδια των αερολυμάτων.



Εικόνα 1.1: Τα κύρια προϊόντα αποσύνθεσης από την καύση της κυτταρίνης. Η λεβογλυκοζάνη είναι η κύρια ένωση ενώ η μαννοζάνη και η γαλακτοζάνη, όπως και η λεβογλυκοζάνη, σχηματίζονται από την καύση της ημικυτταρίνης.

1.2. Χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης

1.2.1. Ιστορικά στοιχεία της Χρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης

Το 1990, ο Alpert εισήγαγε μια παραλλαγή της χρωματογραφίας κανονικής φάσης, για το διαχωρισμό πολικών ενώσεων, όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, πεπτίδια, αμινοξέα και νουκλεοτίδια, χρησιμοποιώντας υδατο-οργανική κινητή φάση [Alpert, 1990]. Η παραλλαγή αυτή ονομάστηκε χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης και καθιερώθηκε διεθνώς με το ακρωνύμιο "HILIC" (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography). Ωστόσο, η τεχνική HILIC είχε χρησιμοποιηθεί ακόμη παλαιότερα, κάτι που δείχνει ότι η αναζήτηση των απαντήσεων για τους μηχανισμούς που διέπουν αυτό το νέο μοντέλο διαχωρισμού ξεκίνησαν με τις πρώτες εφαρμογές. Το 1951 ο Gregor και οι συνεργάτες του ανέφεραν

πρώτοι την ύπαρξη μιας στιβάδας ύδατος στην επιφάνεια υδρόφιλων στατικών φάσεων, όπως είναι οι στήλες από ιονανταλλακτικές ρητίνες. Λίγο αργότερα, το 1952, οι Samuelson και Sjöström περιέγραψαν το διαχωρισμό μονοσακχαριτών με ιονανταλλακτική στήλη μέσω βαθμιδωτής έκλουσης. Το 1954 οι Rückert και Samuelson πρότειναν ότι η έλλειψη συγκράτησης μη ηλεκτρολυτικών ενώσεων σε ιονανταλλακτικές στήλες σχετίζεται με την υδατική στιβάδα. Η ίδια τεχνική είχε χρησιμοποιηθεί επίσης και το 1975 για τη χρωματογραφική ανάλυση σακχάρων και ολιγοσακχαριτών [Linden, *et al.*, 1975, Palmer, 1975]. Οι διαχωρισμοί αυτοί όμως είχαν περιορισμένη εφαρμογή λόγω της χρήσης του ανιχνευτή δείκτη διάθλασης. Επιπλέον, από τη μελέτη των Havlicek και Samuelson [Havlicek, *et al.*, 1975] προέκυψαν πολύ ικανοποιητικοί διαχωρισμοί ολιγοσακχαριτών με τη χρήση στηλών αποτελούμενων από ιονανταλλακτικές ρητίνες τύπου πηκτής. Η τεχνική HILIC είχε επίσης χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό κοκαΐνης σε δείγμα ορού αίματος [Lampert, *et al.*, 1989], ενώ ο Rabel και οι συνεργάτες του παρατήρησαν για πρώτη φορά ότι η τεχνική αυτή είναι μια παραλλαγή της χρωματογραφίας κανονικής φάσης [Rabel, *et al.*, 1976].

1.2.2. Μηχανισμός κατακράτησης στην HILIC

Οι ενώσεις που μπορούν να διαχωριστούν εφαρμόζοντας την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) περιλαμβάνουν από πολύ υδρόφοβα μόρια, όπως τα καροτενοειδή έως πολύ υδρόφιλα, όπως είναι οι υδατάνθρακες και τα αμινοξέα. Κατά παράδοση, οι υδρόφιλες ενώσεις διαχωρίζονται με την χρωματογραφία κανονικής φάσης ενώ οι περισσότερο υδρόφοβες ενώσεις με τη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (RPLC).

Όπως αναφέρθηκε ήδη, ο Alpert (1990) ανέδειξε την τεχνική HILIC για το διαχωρισμό πολικών ενώσεων, σύμφωνα με τον οποίο, οι προς ανάλυση ενώσεις αλληλεπιδρούν με μια υδρόφιλη στατική φάση και εκκλούνται με μια σχετικά υδρόφοβη κινητή φάση, αποτελούμενη από μίγμα ακετονιτρίλιο, ACN και ύδωρ. Σύμφωνα με τον Alpert, ο όρος HILIC θα πρέπει να χρησιμοποιείται όταν α) ο ισχυρός διαλύτης έκλουσης είναι το ύδωρ και β) ο μηχανισμός κατακράτησης λαμβάνει χώρα μέσω κατανομής.

Η διάκριση μεταξύ της HILIC και της χρωματογραφίας κανονικής φάσης τίθεται κατά μία έννοια, υπό συνεχή εξέταση στη διεθνή βιβλιογραφία. Αν και η κατακράτηση στην RPLC λαμβάνει χώρα κυρίως μέσω φαινομένων επιφανειακής προσρόφησης, ο Alpert πρότεινε ότι ο μηχανισμός κατακράτησης στην HILIC περιλαμβάνει την κατανομή μιας ένωσης μεταξύ του μεγαλύτερου όγκου της κινητής φάσης και μιας στιβάδας, αποτελούμενης στο μεγαλύτερο ποσοστό από ύδωρ και μερικώς ακινητοποιημένης στην επιφάνεια

της στατικής φάσης. Τα επιχειρήματα για τον μηχανισμό κατανομής προέκυψαν από πειράματα κατακράτησης και διαχωρισμού υδατανθράκων που πραγματοποιήθηκαν από τους Verhaar και Kuster [Verhaar, *et al.*, 1982], Orth και Engelhardt [Orth, *et al.*, 1982] και Nikolov και Reilly [Nikolov, *et al.*, 1985] παρουσία ύδατος στην κινητή φάση και με τη χρήση στηλών από μη επικαλυμμένη πυριτία και πυριτία επικαλυμμένη με διαφορετικές αμινομάδες. Τα πειράματα αυτά ανέδειξαν τη συνεισφορά της κατανομής στο μηχανισμό κατακράτησης, αφού οι στατικές φάσεις έχουν τη δυνατότητα συγκράτησης μέρους της κινητής φάσης με μεγάλη περιεκτικότητα σε ύδωρ, υπό τη μορφή στιβάδας. Από τις μελέτες αυτές προέκυψε ότι: α) η αύξηση του χρόνου κατακράτησης είναι ανάλογη με την αύξηση του μεγέθους των μορίων και β) οι χρόνοι κατακράτησης των μορίων επηρεάζονται σημαντικά με τη μεταβολή της ιοντικής ισχύος στην κινητή φάση.

Η ύπαρξη μιας “ακίνητοποιημένης” στιβάδας ύδατος έχει λάβει ευρεία αποδοχή όπως και ο μηχανισμός κατανομής υγρού-υγρού. Η ύπαρξη μιας στιβάδας με μεγάλη περιεκτικότητα σε ύδωρ στην επιφάνεια μιας πολικής στατικής φάσης, αναδεικνύει το ρόλο του ύδατος στο μηχανισμό κατακράτησης σε στατικές φάσεις με βάση την πυριτία. Τα μόρια της ένωσης διεισδύουν εντός της υδατικής στιβάδας και αλληλεπιδρούν με την επιφάνεια της στατικής φάσης. Έτσι, ο μηχανισμός κατακράτησης μιας πολικής ένωσης μπορεί να περιλαμβάνει τόσο την *κατανομή* όσο και την *επιφανειακή προσρόφηση*.

Εξετάζοντας το φαινόμενο από μια διαφορετική οπτική γωνία, μπορεί να ειπωθεί ότι η στιβάδα ύδατος είναι δυναμικά ακίνητοποιημένη στην επιφάνεια μιας στατικής φάσης, γεγονός το οποίο είναι πολύ διαφορετικό από τη μόνιμη πρόσδεση, μέσω χημικού δεσμού, όπως είναι για παράδειγμα οι ανθρακικές αλυσίδες σε μια στήλη αντίστροφης φάσης. Ο Alpert σε μια πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι: «*ένα μοντέλο για το μηχανισμό κατακράτησης υποδεικνύει την κατανομή μιας ένωσης μεταξύ της κινητής φάσης και μιας αργά κινούμενης στιβάδας ύδατος με την οποία η στατική φάση είναι ενυδατωμένη*» [Alpert, 2007]. Από την άλλη πλευρά, η υδατική στιβάδα δεν δημιουργείται σε μια αδρανή στατική φάση. Έτσι, τα μόρια του ύδατος δεν μπορούν να αποτρέψουν το σύνολο των δομικών ομάδων μιας πολικής στατικής φάσης, όπως οι σιλανομάδες, οι αμινομάδες κ.α., από την αλληλεπίδραση με τους αναλύτες. Κατά συνέπεια, πολικές ενώσεις σχετικά μικρού μοριακού βάρους θα μπορούσαν εύκολα να διεισδύσουν στην υδατική στιβάδα και να αλληλεπιδράσουν απευθείας με τις δομικές ομάδες της επιφάνειας της στήλης.

Ανεξαρτήτως της παραπάνω υπόθεσης, η αποσαφήνιση του μηχανισμού κατακράτησης στην HILIC είναι υπό συνεχή εξέταση και οι απόψεις δίστανται σχετικά με το ζήτημα αυτό. Ένα μέρος της βιβλιογραφίας υποστηρίζει ότι ο κύριος μηχανισμός περιλαμβάνει την κατανομή των ενώσεων στην υδατική στιβάδα της επιφάνειας της στατικής φάσης και επίσης ότι οι ενώσεις αλληλεπιδρούν άμεσα με την ίδια στατική φάση. Επιπλέον, χρησιμο-

12

ποιείται συχνά ο όρος “υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις” χωρίς να διασαφηνίζεται περαιτέρω [Alpert, 1990, Alpert, *et al.*, 1994, Guo, 2005, Guo, *et al.*, 2003, Nikolov, *et al.*, 1985, Orth, *et al.*, 1982, Shou, *et al.*, 2005, Verhaar, *et al.*, 1982]. Οι Orth και Engelhardt έδειξαν ότι η αύξηση της περιεκτικότητας του νερού στην κινητή φάση θα μπορούσε επίσης να αυξήσει την ποσότητα του νερού που κατακρατείται στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Το πάχος της υδατικής αυτής στιβάδας από την αύξηση του νερού μέχρι το όριο κορεσμού, εξαρτάται από τον αριθμό και τη φύση των χημικά συνδεδεμένων πολικών ομάδων στη στατική φάση. Αναλύοντας ξανά τα αποτελέσματα αυτά, ο Hemström [Hemström, *et al.*, 2006] κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η κατακράτηση του αναλύτη μειώνεται με την αύξηση της περιεκτικότητας του νερού στην κινητή φάση, δεδομένου ότι, σε διαχωρισμούς που διέπονται από τη διάχυση, η ισορροπία του διαχωρισμού ενός αναλύτη μεταξύ των δύο φάσεων εξαρτάται από την σχετική διαλυτότητα, και, όσο η περιεκτικότητα σε νερό της κινητής φάσης αυξάνει, γίνεται όλο και πιο συγγενές με τη συγκρατημένη υδατική στιβάδα. Αυτό οδηγεί σε αυξημένο χρόνο παραμονής του αναλύτη στην κινητή φάση και συνακόλουθη μείωση της κατακράτησης. Έτσι, η κατακράτηση είναι ευθέως ανάλογη προς την πολικότητα του αναλύτη και αντιστρόφως ανάλογη προς την πολικότητα της κινητής φάσης και, στη HILIC, κινητές φάσεις με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε νερό είναι λιγότερο πολικές.

Άλλες μελέτες, υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός πολύπλοκου μηχανισμού στον οποίο, πιθανό να λαμβάνουν χώρα υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου ή ιόντος-διπόλου [Berthod, *et al.*, 1998, Boersema, *et al.*, 2008, Christopherson, *et al.*, 2006, Guo, *et al.*, 2005, Hao, *et al.*, 2007, Kovalova, *et al.*, 2009, Li, *et al.*, 2004, Lin, *et al.*, 2007, Liu, *et al.*, 2009, Olsen, 2001, Pack, *et al.*, 2005, Quiming, *et al.*, 2008, Quiming, *et al.*, 2007, Strega, 1998, Tanaka, *et al.*, 2003, Tolstikov, *et al.*, 2002, Vikingsson, *et al.*, 2008, Wu, *et al.*, 2008, Xuan, *et al.*, 2006, Zhou, *et al.*, 2008] και αφορά σε αναλύτες με περισσότερες από μία λειτουργικές ομάδες στις χημικές δομές τους. Η άποψη αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι οι πολικές ομάδες που συνδέονται με τα διάφορα είδη των στατικών φάσεων προσελκύουν τα μόρια του νερού, σχηματίζοντας μία υδατική στιβάδα πάνω από την επιφάνεια. Έτσι, ένας πολικός αναλύτης που διαλύεται στην κινητή φάση υποβάλλεται σε κατανομή μεταξύ των δύο υδατικών φάσεων: την ημι-ακίνητοποιημένη υδατική στιβάδα και την κινητή φάση, που έχει επίσης ένα μικρό ποσοστό σε υδατικό περιεχόμενο. Οι πολικοί αναλύτες έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με την ακίνητοποιημένη ημι-υδατική στιβάδα από ότι με την, κατά κύριο λόγο, οργανική κινητή φάση, δεδομένου ότι είναι καλύτερα διαλυτοποιημένοι στην πρώτη. Η προτίμηση αυτή οδηγεί σε αυξημένη αλληλεπίδραση του αναλύτη με την υδατική στιβάδα, αυξάνοντας την κατακράτηση. Στην Εικόνα 1.2 απεικονίζεται ένας προτεινόμενος πολυτροπικός μηχανισμός κατά τον οποίο λαμβάνει χώρα κατανομή και

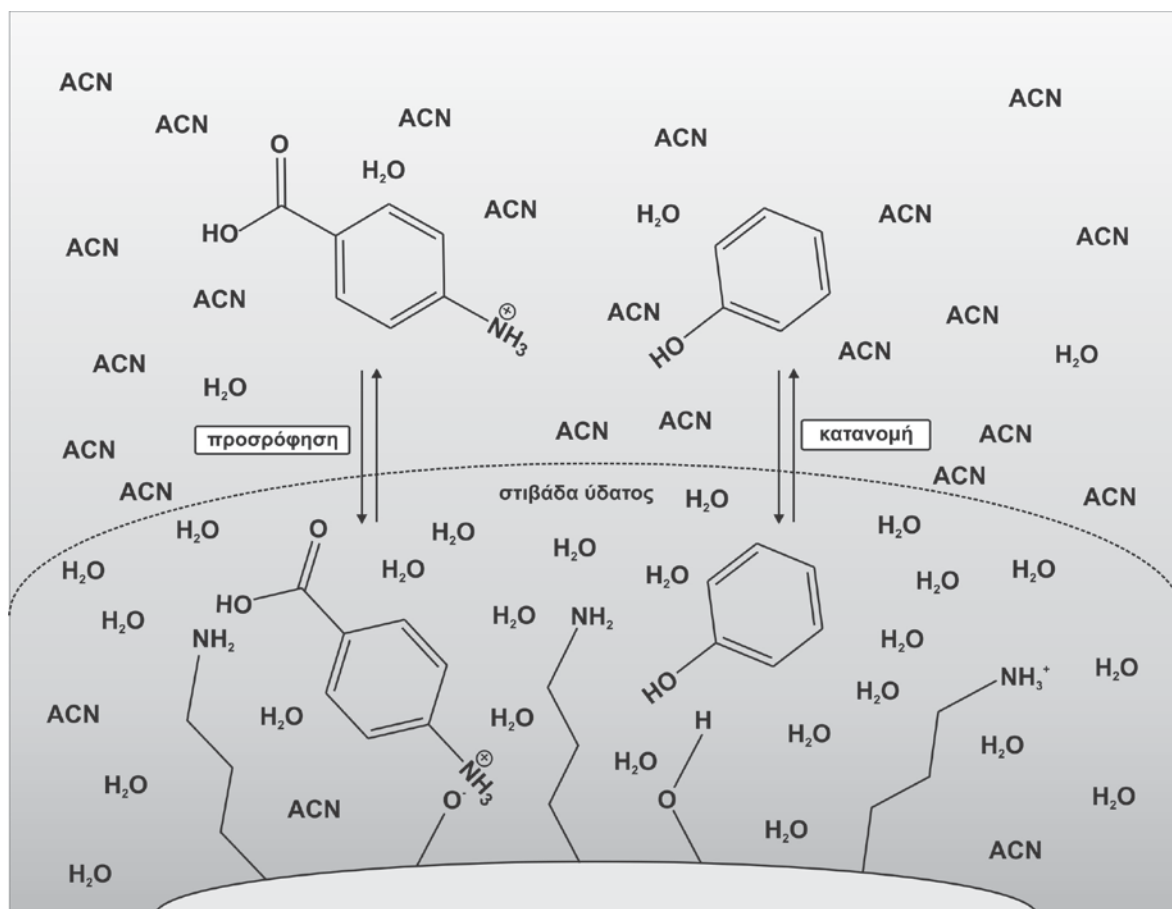
επιφανειακή προσρόφηση ανάλογα με τις ιδιότητες των ενώσεων και της στατικής φάσης [Nguyen, *et al.*, 2008]. Ο Lü και οι συνεργάτες του [Lü, *et al.*, 2010] παρατήρησαν ότι η αλληλεπίδραση των διαφόρων αναλυτών με στήλη πυριτίας επικαλυμμένη με καρβοξυμεθυλο-χιτοζάνη περιλαμβάνει ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιονισμένων αναλυτών και χημικά επικαλυμμένες στατικές φάσεις και αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου μεταξύ των ίδιων ομάδων και των μη ιονισμένων πολικών ουσιών. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές δείχνουν ότι στο διαχωρισμό των αναλυτών εμπλέκονται τόσο η κατανομή όσο και η προσρόφηση.

Ο Jandera με τους συνεργάτες του [Jandera, *et al.*, 2010] πρότειναν την ταυτόχρονη συμμετοχή των διαφόρων πιθανών μηχανισμών με πολικές στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό ορισμένων φλαβονοειδών με ανάστροφη φάση και HILIC στην ίδια στήλη, μόνο με τη μεταβολή του ποσοστού του ACN στην κινητή φάση. Η πρόταση αυτή βασίζεται στην παρατήρηση των υδρόφοβων αλλά και των υδρόφιλων τύπων διαχωρισμών με την ίδια στατική φάση, που αρχικά προορίζονταν για τη HILIC. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι δεν είναι όλες οι πολικές φάσεις υποψήφιες για τον πολυτροπικό μηχανισμό διαχωρισμού, αφού η πολυτροπική επίδραση παρατηρήθηκε μόνο με τη στήλη Luna HILIC. Η εμπορική αυτή στήλη περιείχε τόσο οξυαιθυλενικές όσο και ομάδες διόλης, με μια τάση για διαχωρισμό από ανάστροφη φάση στην πρώτη και από HILIC στη δεύτερη.

Πρόσφατα, έγιναν μελέτες για να επιβεβαιώσουν τις αλληλεπιδράσεις που εμπλέκονται στους διαχωρισμούς με HILIC [Kawachi, *et al.*, 2011, Orentiené, *et al.*, 2011]. Αξιολογήθηκαν, λοιπόν, διάφορες εμπορικές στήλες με διαφορετικές χημικές ιδιότητες (κατιονικές, ανιονικές, ουδέτερες και διιοντικές καθώς και εκείνες που περιέχουν πολικές ομάδες) που χρησιμοποιούνται στην HILIC [Dinh, *et al.*, 2011]. Κάθε ομάδα που παρουσιάζει συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις με τις ενώσεις δοκιμής, βασίζεται κατά κύριο λόγο στην προσρόφηση, γεγονός που δείχνει ότι τόσο η προσρόφηση όσο και η κατανομή παίζουν σημαντικό ρόλο στην κατακράτηση στη HILIC.

Τέλος, ο μηχανισμός κατακράτησης στη HILIC εξαρτάται όχι μόνο από τη στατική φάση, αλλά και από τη χημική φύση του αναλύτη και από την σύνθεση της κινητής φάσης [Karatapanis, *et al.*, 2010]. Ο Α. Καραταπάνης στην εργασία του [Karatapanis, *et al.*, 2011c] αναλύει κάποιες υδατοδιαλυτές βιταμίνες και αποδεικνύει ότι υπάρχει μια μεταβατική περίοδος από τον μηχανισμό κατανομής στον μηχανισμό προσρόφησης, όταν το ποσοστό του οργανικού διαλύτη στη σύνθεση της κινητής φάσης αυξάνεται. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, αν και ο μηχανισμός του πολυτροπικού διαχωρισμού της HILIC είναι ευρέως αποδεκτός, πολλοί συγγραφείς τονίζουν τη σημασία της διαδικασίας κατανομής σε

αυτόν τον τρόπο διαχωρισμού, όπως είχε αρχικά προταθεί [McCalley, 2007, Takeuchi, *et al.*, 2010].



Εικόνα 1.2: Απεικόνιση του προτεινόμενου μηχανισμού κατακράτησης στην HILIC.

1.2.3. Μοντέλα κατανομής και επιφανειακής προσρόφησης

Πριν φθάσουμε στο μοντέλο κατανομής και επιφανειακής προσρόφησης της HILIC, θα ήταν ωφέλιμο να αναφερθούν οι βασικές εξισώσεις που περιγράφουν την κατανομή και την επιφανειακή προσρόφηση. Η RPLC έχει τις αρχές της στη χρωματογραφία υγρού-υγρού και η κατακράτηση θεωρείται ότι βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά στο μηχανισμό κατανομής. Η εξίσωση που περιγράφει το μηχανισμό κατανομής στην RPLC είναι η ακόλουθη:

$$\log k' = \log k'_w - S\phi \quad (1.1)$$

όπου: k' είναι ο παράγοντας κατακράτησης της ένωσης, k'_w είναι ο παράγοντας κατακράτησης του ασθενούς διαλύτη έκλουσης (H_2O), φ το κλάσμα του όγκου του ισχυρού διαλύτη έκλουσης (% περιεκτικότητα) και S η κλίση της εξίσωσης $\log k' = f(\varphi)$.

Υπάρχουν διάφορα αποδεδειγμένα μοντέλα που περιγράφουν το μηχανισμό κατακράτησης στη χρωματογραφία κανονικής φάσης. Το πρώτο μοντέλο που αφορά τη χρωματογραφία προσρόφησης προτάθηκε από τον Snyder [Snyder, 1968] και αργότερα συνδυάστηκε με το μοντέλο των Soczewinski και Wachtmeister [Soczewinski, 1969, Soczewinski, *et al.*, 1962] οπότε και προέκυψε το μοντέλο Snyder- Soczewinski, η έκλυση λαμβάνει χώρα μέσω αντικατάστασης μορίων μιας ένωσης από μόρια διαλύτη (και αντίστροφα) πάνω στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Για τα συμβατικά χρωματογραφικά συστήματα κανονικής φάσης, όπου η κατακράτηση βασίζεται στην επιφανειακή προσρόφηση, η σχέση που συνδέει τον παράγοντα κατακράτησης μιας ένωσης (k') με το γραμμομοριακό κλάσμα n του ισχυρού διαλύτη έκλουσης B της κινητής φάσης δίνεται από την ακόλουθη εξίσωση [Nikitas, *et al.*, 2002, Snyder, *et al.*, 1980]:

$$\log k' = \log k'_B - \frac{As}{n_B} \log N_B \quad (1.2)$$

όπου: k'_B είναι ο παράγοντας κατακράτησης της ένωσης παρουσία μόνο του διαλύτη B στην κινητή φάση, As και n_B είναι σταθερές που σχετίζονται με τις περιοχές της επιφάνειας της στήλης που είναι καλυμμένες από μόρια της ένωσης και του διαλύτη B αντίστοιχα.

Η κατασκευή διαγραμμάτων $\log k'$ συναρτήσει της % περιεκτικότητας του ύδατος (κατανομή) και του λογάριθμου της περιεκτικότητας του ύδατος (προσρόφηση) στην κινητή φάση μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για το αν η κατανομή ή η επιφανειακή προσρόφηση είναι ο επικρατέστερος μηχανισμός κατακράτησης. Στην περίπτωση προσαρμογής των δύο μοντέλων σε συνθήκες HILIC, οι δύο εξισώσεις που περιγράφηκαν παραπάνω παίρνουν την ακόλουθη μορφή:

$$\log k' = \log k'_{org} - S\varphi \quad (1.1)'$$

όπου: $\log k'_{org}$ είναι ο παράγοντας κατακράτησης του ασθενούς διαλύτη έκλουσης (δηλ. ACN), και φ το κλάσμα του όγκου του ισχυρού διαλύτη έκλουσης (δηλ. το ύδωρ) και

$$\log k' = \log k'_w - \frac{As}{n_w} \log \varphi \quad (1.2)'$$

όπου: k'_w είναι ο παράγοντας κατακράτησης της ένωσης παρουσία μόνο υδατικού διαλύτη στην κινητή φάση, A_s και n_w είναι σταθερές που σχετίζονται με τις περιοχές της επιφάνειας της στήλης που είναι καλυμμένες από μόρια της ένωσης και μόρια ύδατος αντίστοιχα, και φ είναι το κλάσμα του όγκου του ισχυρού διαλύτη έκλουσης (δηλ. το ύδωρ) [Hemström, *et al.*, 2006, Snyder, *et al.*, 1988].

Πέρα από τα μοντέλα κατανομής και επιφανειακής προσρόφησης, προτάθηκε πρόσφατα από τον Jin και τους συνεργάτες του ένα μοντέλο το οποίο, σύμφωνα με τους συγγραφείς, περιγράφει ικανοποιητικά το μηχανισμό κατακράτησης στη HILIC και δίνεται από την εξίσωση:

$$\ln k' = a + b \ln \varphi + c \varphi \quad (1.3)$$

όπου: a είναι ο συντελεστής που σχετίζεται με την ενέργεια αλληλεπίδρασης μεταξύ των αναλυτών και της στατικής και κινητής φάσης, b είναι συντελεστής σχετιζόμενος με την άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ αναλύτη-στατικής φάσης και c ο συντελεστής που σχετίζεται με την ενέργεια αλληλεπίδρασης μεταξύ των μορίων του αναλύτη και της κινητής φάσης. Το μοντέλο αυτό προέκυψε από τη μελέτη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς οκτώ νουκλεοζιτών σε τέσσερις διαφορετικές κινητές φάσεις. Από τη σύγκριση διαφορετικών μοντέλων κατακράτησης, η εξίσωση (1.3) έδωσε την καλύτερη προσαρμογή στους χρόνους κατακράτησης των ενώσεων, με το σχετικό σφάλμα των προβλεπόμενων τιμών των χρόνων κατακράτησης να είναι μικρότερο από 5% [Jin, *et al.*, 2008].

1.2.4. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της HILIC

Στη HILIC, η παρουσία του ύδατος στην κινητή φάση προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα συγκριτικά με την κλασική χρωματογραφία κανονικής φάσης. Συγκεκριμένα, η προετοιμασία της κινητής φάσης είναι πιο απλή διότι απουσία απολικών διαλυτών δεν απαιτείται έλεγχος ως προς το περιεχόμενο ύδωρ και αποφεύγονται προβλήματα σχετικά με την ομοιογένεια της κινητής φάσης. Επιπλέον, η παρουσία απολικών διαλυτών στην χρωματογραφία κανονικής φάσης (συχνά η κινητή φάση παρασκευάζεται με βάση το εξάνιο) δυσχεραίνει τη διαλυτότητα των πολικών ενώσεων. Επίσης, ο συνδυασμός της χρωματογραφίας κανονικής φάσης με τον ανιχνευτή μαζών είναι προβληματικός διότι ο ιονισμός δεν επιτυγχάνεται εύκολα παρουσία οργανικών και απολικών διαλυτών σε υψηλά ποσοστά στην κινητή φάση. Η σειρά έκλουσης στην HILIC είναι περίπου αντίθετη από αυτήν που ισχύει στην RPLC [Alpert, 1990], γεγονός που σημαίνει ότι η τεχνική της HILIC

είναι αποτελεσματική για το διαχωρισμό ενώσεων που είναι προβληματικές στην RPLC. Από τη συμπληρωματική εκλεκτικότητα μεταξύ της HILIC και της RPLC προκύπτει ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα που είναι η δυνατότητα συνδυασμού με τεχνικές απομόνωσης και καθαρισμού δειγμάτων. Όταν η HILIC χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (RP-SPE), ο ισχυρός διαλύτης έκλουσης (οργανικός) που χρησιμοποιείται για την εκρόφηση των ενώσεων από τη συσκευή SPE, αποτελεί τον ασθενή διαλύτη έκλουσης στην HILIC. Επιπλέον, η εκχύλιση υγρού-υγρού ή ακόμα και η καταβύθιση πρωτεϊνών σε ένα δείγμα γίνεται συνήθως με τη χρήση ενός οργανικού διαλύτη. Κατά συνέπεια, είναι δυνατή η απευθείας έγχυση του εκλούσματος εκχύλισης στο σύστημα της HPLC, γεγονός το οποίο ελαττώνει σημαντικά το χρόνο κατεργασίας πριν την ανάλυση (π.χ. εξάτμιση και επαναδιαλυτοποίηση) καθώς και τις πιθανές απώλειες συστατικών κατά τη διάρκεια μιας πειραματικής πορείας [Wang, *et al.*, 2005]. Εντούτοις, αυτή η προσέγγιση είναι εφικτή σε περιπτώσεις που οι προς ανάλυση ενώσεις εμφανίζουν κατακράτηση σε στατικές φάσεις τόσο της RPLC όσο και της HILIC. Η συμπληρωματική εκλεκτικότητα της HILIC ως προς την RPLC καθιστά επίσης δυνατή την ανάπτυξη διαχωρισμών δύο διαστάσεων (2-D LC-LC) καθώς και στις δύο τεχνικές χρησιμοποιούνται υδατο-οργανικές κινητές φάσεις, γεγονός το οποίο λειτουργεί ευνοϊκά στη μεταφορά κλασμάτων κινητής φάσης μεταξύ των δύο στατικών φάσεων [McCalley, 2007].

Η παρουσία οργανικού διαλύτη σε υψηλά ποσοστά (συνήθως 60-95%, v/v), στην HILIC, ελαττώνει σημαντικά το ιξώδες της κινητής φάσης με αποτέλεσμα η πίεση που αναπτύσσεται στη στήλη να είναι πολύ χαμηλότερη από αυτή στην RPLC. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένα επιπλέον σημαντικό πλεονέκτημα αφού είναι δυνατή η εφαρμογή υψηλών ροών κινητής φάσης και κατά συνέπεια η ελάττωση του χρόνου ανάλυσης [Appelblad, *et al.*, 2008, Pack, *et al.*, 2005]. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η αύξηση της ροής της κινητής φάσης είναι ευνοϊκή μέχρι το σημείο όπου δεν λαμβάνει χώρα σημαντική μείωση της απόδοσης της χρωματογραφικής στήλης.

Ένα ακόμα πλεονέκτημα που προκύπτει από την υψηλή περιεκτικότητα της κινητής φάσης σε οργανικό διαλύτη είναι η μεγαλύτερη ευαισθησία κατά το συνδυασμό της HILIC με μεθόδους ανίχνευσης όπως είναι ο ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών (MS), και ο ανιχνευτής σκέδασης φωτός (ELSD). Όσον αφορά τον ανιχνευτή μαζών, η υψηλή πτητικότητα της κινητής φάσης είναι ιδανική για τη δημιουργία αερολύματος, την αποτελεσματική εξάτμιση του διαλύτη και τον ιονισμό των αναλυόμενων ενώσεων [Shou, *et al.*, 2005]. Ομοίως, ένα από τα βασικά στάδια στη λειτουργία του ανιχνευτή σκεδασμού φωτός είναι η δημιουργία αερολύματος και στη συνέχεια η εξάτμιση του διαλύτη. Έτσι, και στην περίπτωση αυτή, η λειτουργία του ανιχνευτή ευνοείται σημαντικά από την παρουσία της κινητής φάσης με υψηλή πτητικότητα [Appelblad, *et al.*, 2008]. Επιπλέον, η HILIC αποτελεί μια

εναλλακτική τεχνική διαχωρισμού βασικών ενώσεων. Ως γνωστό, οι οργανικές βάσεις αποτελούν μια ιδιαίτερα προβληματική κατηγορία ενώσεων στην τεχνική της RPLC, αφενός λόγω της μικρής κατακράτησης και αφετέρου λόγω της λήψης ασύμμετρων χρωματογραφικών κορυφών [McCalley, 2010].

Η τεχνική της HILIC, εκτός από πλεονεκτήματα έναντι άλλων τεχνικών διαχωρισμού, παρουσιάζει επίσης περιορισμούς και μειονεκτήματα. Ένας σημαντικός περιορισμός της τεχνικής προκύπτει από τη μειωμένη διαλυτότητα των αλάτων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων, λόγω της παρουσίας οργανικού διαλύτη (ACN) σε υψηλά ποσοστά. Για το λόγο αυτό, τα ευρέως χρησιμοποιούμενα άλατα είναι το μυρμηκικό αμμώνιο και το οξικό αμμώνιο, καθώς αυτά εμφανίζουν καλή διαλυτότητα παρουσία οργανικού διαλύτη ακόμη και σε ποσοστό 90 ή 95% (v/v). Εντούτοις, τα άλατα αυτά καλύπτουν συμπληρωματικά ένα σημαντικό εύρος pH (από 3,0 έως 6,0). Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι ο όρος «περιορισμός» στη χρήση αλάτων αφορά κυρίως το μέρος της ανάπτυξης ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού. Από την άλλη μεριά, η χρήση μόνο πτητικών αλάτων στην κινητή φάση λειτουργεί ευνοϊκά για τους ανιχνευτές, ESI-MS και ELSD. Επιπλέον, άλατα και τροποποιητές που έχουν χρησιμοποιηθεί με άλλες μεθόδους ανίχνευσης (υπεριώδους, UV και συστοιχίας διόδων, DAD), είναι το οξικό νάτριο, το ανθρακικό αμμώνιο, το φωσφορικό οξύ σε συνδυασμό με τριαιθυλαμίνη, το χλωριούχο αμμώνιο, το μεθυλοφωσφορικό νάτριο, το φωσφορικό αμμώνιο, το τριφθοροοξικό οξύ, το μυρμηκικό οξύ και το οξικό οξύ [Boersema, *et al.*, 2008].

Στα μειονεκτήματα της HILIC συγκαταλέγονται και οι μεγάλοι χρόνοι εξισορρόπησης της στήλης κυρίως στη βαθμιδωτή έκλουση. Σε σύγκριση με την RPLC, όπου ο χρόνος εξισορρόπησης της στήλης κυμαίνεται από 15 έως 20 min, ο αντίστοιχος χρόνος στην HILIC συνήθως κυμαίνεται από 45 έως 60 min [Ali, *et al.*, 2007]. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που οι χρόνοι εξισορρόπησης είναι μεγαλύτεροι της μιας ώρας, γεγονός το οποίο εξαρτάται από το χρησιμοποιούμενο άλας στην κινητή φάση και από τη φύση της ίδιας της στατικής φάσης. Μεγάλοι χρόνοι εξισορρόπησης, συνήθως, απαιτούνται για στήλες που φέρουν φορτίο, όπου τα ιόντα αντίθετου φορτίου, προερχόμενα από το άλας του ρυθμιστικού διαλύματος, έχουν την τάση να προσροφούνται ηλεκτροστατικά στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Το μειονέκτημα αυτό μπορεί να αντισταθμιστεί, έως ένα βαθμό, με τη δυνατότητα εφαρμογής υψηλών ροών λόγω του χαμηλού ιξώδους της κινητής φάσης με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του χρόνου εξισορρόπησης [Pack, *et al.*, 2005]. Ένα άλλο μειονέκτημα είναι η πολύ ισχυρή κατακράτηση ή ακόμα και η μη αντιστρεπτή προσρόφηση ενώσεων που εμφανίζουν μεγάλη χημική συγγένεια με τη στατική φάση. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται τόσο σε βασικές ενώσεις, οι οποίες κατακρατούνται ισχυρά από την αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια μιας στατικής φάσης (π.χ. ομάδες σιλανόλης) με-

σω ισχυρών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, όσο και σε όξινες ενώσεις με τη χρήση στηλών που φέρουν θετικά φορτισμένες ομάδες (π.χ. αμινομάδες). Μειονέκτημα επίσης αποτελεί η ευαισθησία ορισμένων στατικών φάσεων, με βάση την πυριτία, σε μεγάλες περιεκτικότητες ύδατος στην κινητή φάση. Συγκεκριμένα, υπάρχουν στατικές φάσεις με βάση την πυριτία, όπως η αμινο-πυριτία και σε μικρότερο βαθμό η διόλη-πυριτία στις οποίες παρατηρείται αποκόλληση υλικού (column bleeding) παρουσία ύδατος σε ποσοστό 30-50% (v/v) με αποτέλεσμα τη βαθμιαία μείωση της απόδοσης της στήλης. Το φαινόμενο αυτό αφενός μειώνει σημαντικά το χρόνο ζωής της στήλης και αφετέρου δυσχεραίνει τη χρήση γενικών ανιχνευτών (MS, ELSD) λόγω αυξημένου θορύβου ή εμφάνισης επιπλέον χρωματογραφικών κορυφών πέραν των αναλυόμενων συστατικών [Jandera, 2008]. Τέλος, η HILIC είναι μια τεχνική διαχωρισμού λιγότερο “φιλική” προς το περιβάλλον, σε σύγκριση με την RPLC, λόγω της κατανάλωσης μεγαλύτερων όγκων οργανικού διαλύτη [McCalley, 2010].

1.2.5. Υδατάνθρακες και υγρή χρωματογραφία

Οι ενώσεις των σακχάρων που μελετήθηκαν είναι υδατάνθρακες και χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες ιδιότητες οι οποίες καθιστούν δύσκολο το χρωματογραφικό διαχωρισμό τους. Συγκεκριμένα, περιέχουν στο μόριό τους πολλαπλές υδροξυλομάδες (πολικές ενώσεις), είναι θερμικά ασταθείς ενώσεις και ανιχνεύονται δύσκολα με οπτικά μέσα. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των ενώσεων αυτής της κατηγορίας είναι η χρωματογραφία ιονανταλλαγής [Cataldi, *et al.*, 2000, Rocklin, *et al.*, 1983] και πρόσφατα η HILIC [Churms, 1996, Linden, *et al.*, 1975, Palmer, 1975], ενώ για την ανίχνευση χρησιμοποιούνται κυρίως ο ELSD [Megoulas, *et al.*, 2005] και ο ανιχνευτής MS [Zaia, 2004]. Ένα άρθρο ανασκόπησης σχετικό με διαχωρισμούς υδατανθράκων με την τεχνική HILIC έχει δημοσιευτεί μόλις το 1996 [Churms, 1996], ενώ παλαιότερα η χρωματογραφία κανονικής φάσης ήταν η κύρια τεχνική διαχωρισμού [Churms, 1990, Verzele, *et al.*, 1987]. Υπάρχουν πολυάριθμες εφαρμογές της HILIC για το διαχωρισμό υδατανθράκων μερικές από τις οποίες είναι οι υδατάνθρακες μικρού μοριακού βάρους σε τρόφιμα και αφεψήματα [Martínez Montero, *et al.*, 2004], τα σάκχαρα σε δείγματα φαρμάκων [Wang, *et al.*, 2004], τα γλυκοαλκαλοειδή και τα προϊόντα υδρόλυσής τους από φυτά του γένους *Solanaceae* [Friedman, 2004], οι γλυκοζαμινογλυκάνες (βλεννοπολυσακχαρίτες) [Vynios, *et al.*, 2002], οι γλυκοπρωτεΐνες [Novotny, *et al.*, 2005] και η αξιολόγηση της γλυκοσυλίσωσης των πρωτεϊνών [Wuhrer, *et al.*, 2005].

1.3. ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΣΚΕΔΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD)

1.3.1. Εισαγωγή

Από την εμφάνιση των πρώτων συστημάτων HPLC μέχρι σήμερα οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές HPLC είναι οι οπτικοί ανιχνευτές και κυρίως ο φασματομετρικός ανιχνευτής υπεριώδους/ορατού (UV/Vis) και ο ανιχνευτής φθορισμού. Η ευρεία χρήση των ανιχνευτών αυτών οφείλεται αφενός μεν στα άριστα χαρακτηριστικά ποιότητας (χαμηλός ενδογενής θόρυβος, επαναληψιμότητα, σταθερότητα γραμμής βάσης) και αφετέρου στην απλή θεωρητική θεμελίωση της λειτουργίας τους και στο προσιτό κόστος. Ωστόσο, προϋπόθεση για την εφαρμογή του ανιχνευτή UV/Vis αποτελεί η υψηλή μοριακή απορροφητικότητα των προς προσδιορισμό μορίων και αντίστοιχα προϋπόθεση για τον ανιχνευτή φθορισμού αποτελεί η εκπομπή από τα υπό προσδιορισμό μόρια ακτινοβολίας φθορισμού. Ως εκ τούτου, είναι εμφανές ότι για ένα σημαντικό πλήθος μορίων δεν είναι εφικτός ο προσδιορισμός. Το πρόβλημα έχει εν μέρει αντιμετωπισθεί με την ανάπτυξη αντιδράσεων παραγωγοποίησης για την εισαγωγή χρωμοφόρων ή φθορισμοφόρων ομάδων στα υπό προσδιορισμό μόρια. Ωστόσο, σε αυτήν την περίπτωση η αναλυτική μεθοδολογία γίνεται ιδιαίτερα πολύπλοκη, υψηλότερου κόστους και πολλές φορές συνοδεύεται από μία σειρά σημαντικών μειονεκτημάτων (μη ποσοτικές αντιδράσεις, χαμηλή επαναληψιμότητα, συνύπαρξη υπολειμμάτων αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης, κ.α.).

Η ανάγκη ανάπτυξης γενικών ανιχνευτών, δηλαδή ανιχνευτών οι οποίοι έχουν την ικανότητα να εμφανίζουν απόκριση για το σύνολο των μορίων ανεξάρτητα από τις οπτικές τους ή άλλες ιδιότητες, ήταν εμφανής από τα πρώτα χρόνια ανάπτυξης της υγρής χρωματογραφίας. Ο πρώτος γενικός ανιχνευτής που αναπτύχθηκε ήταν ο ανιχνευτής δείκτη διάθλασης, ο οποίος όμως εμφανίζει τρία σημαντικά μειονεκτήματα συγκριτικά με τους καθιερωμένους οπτικούς ανιχνευτές: α) δεν είναι συμβατός με τη βαθμιδωτή έκλουση (συνεπάγεται μεταβολή του δείκτη διάθλασης της κινητής φάσης και συνεπώς προκαλείται μη σταθερή γραμμή βάσης), β) είναι ευαίσθητος στις θερμοκρασιακές μεταβολές και γ) έχει πολύ μικρό συντελεστή απόκρισης για μικρής και μέσης μοριακής μάζας μόρια. Ο ανιχνευτής MS είναι επίσης ένας γενικός ανιχνευτής, ο οποίος εν γένει εμφανίζει ανιχνευσιμότητα της ίδιας τάξης με τον ανιχνευτή UV/Vis. Επίσης, παρουσιάζει το ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό ότι είναι ταυτόχρονα και γενικός ανιχνευτής και υψηλής ειδικότητας. Ωστόσο, η ικανότητα ποσοτικοποίησης που εμφανίζουν οι ανιχνευτές MS υπολείπεται της ικανότητας του ανιχνευτή UV/Vis και του ανιχνευτή φθορισμού. Αυτό οφείλεται στην περιορισμένη γραμμική περιοχή και στην μικρότερη επαναληψιμότητα των λαμβανόμενων αποτελεσμά-

των. Επιπρόσθετα, ιδιαίτερα περιοριστικός παράγοντας για την ευρεία χρήση των ανιχνευτών φασματομετρίας μαζών, είναι το υψηλό τους κόστος.

Τα σάκχαρα είναι ιδιάζουσας σημασίας στη φύση και για το λόγο αυτό απαιτούνται ευαίσθητες αναλυτικές μέθοδοι για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίησή τους. Επιπλέον, αποτελούν πρόκληση ανίχνευσης στην HPLC, δεδομένου ότι δεν διαθέτουν χρωμοφόρες ή ομάδες απορροφούσες στο UV, συνεπώς δεν είναι κατάλληλες για ανιχνευτή UV/Vis. Λόγω της μη πτητικής φύσης των σακχάρων, ο ELSD είναι η καλύτερη επιλογή για αυτόν τον τύπο ανάλυσης για την ανίχνευση κάθε συστατικού που είναι λιγότερο πτητικό σε σχέση με την κινητή φάση (‘ήμι-γενικός’ ανιχνευτής), ανεξάρτητα από τις οπτικές τους ιδιότητες, προσφέροντας εξαιρετική σταθερότητα της γραμμής βάσης και ευαισθησία. Υφίσταται ένα πλήθος μεθόδων HPLC για την ποσοτικοποίηση σακχάρων, με μία από αυτές να περιλαμβάνει τη χρήση της HILIC με ανιχνευτή ELSD. Η υψηλή περιεκτικότητα της κινητής φάσης σε οργανικό διαλύτη αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα για την ευαισθησία οποιασδήποτε μεθόδου που συνδυάζει την HILIC με ELSD.

Ο ELSD είναι ένας ευαίσθητος ανιχνευτής που αποκρίνεται στους περισσότερους αναλύτες και δίνει απόκριση ανάλογη με την ποσότητα ή τη μάζα της ουσίας που περνά από τον ανιχνευτή σε αντίθεση με τον κλασικό ανιχνευτή υπεριώδους που αποκρίνεται γραμμικά σε μεταβολές της συγκέντρωσης. Επιπλέον, η απόκριση του ELSD είναι συχνά λιγότερο εξαρτημένη από τις χημικές ιδιότητες της κάθε ουσίας από ότι των MS και UV. Η λειτουργία του ELSD βασίζεται σε τρία διαδοχικά βήματα - ψεκασμός, εξάτμιση και οπτική ανίχνευση (Σχήμα 1.3.1). Η συνολική διαδικασία λαμβάνει χώρα σε ένα θάλαμο νεφελοποίησης που μπορεί να έχει διάφορες διαστάσεις και όγκους ανάλογα με τον κατασκευαστή. Μπορεί επίσης να προσαρμόζονται στον τύπο της χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται - HPLC, εξαιρετικά υψηλής πίεσης LC (UHPLC), ή μικρο-LC.

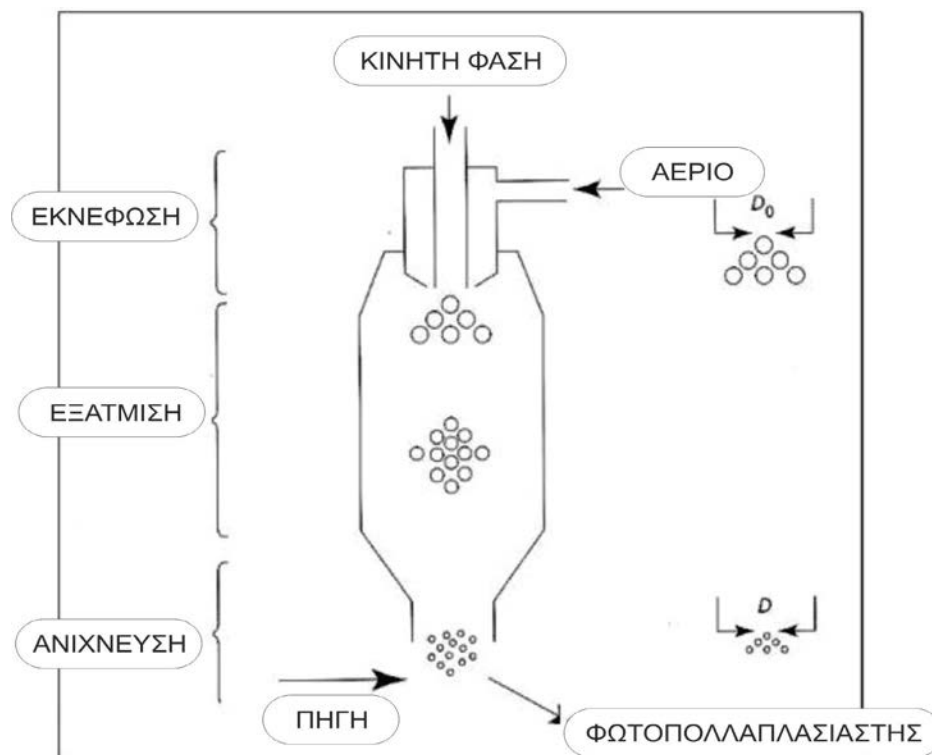
1.3.2. Αρχή Λειτουργίας

Η αρχή λειτουργίας ενός τυπικού συστήματος ELSD εικονίζεται στο Σχήμα 1.3.1. Συνίσταται σε τρεις διαδοχικές διαδικασίες:

A) Εκνέφωση του εκλούσματος της αναλυτικής στήλης με τη βοήθεια φέροντος αερίου (εδάφιο 1.3.2.1.).

B) Εξάτμιση των συστατικών της κινητής φάσης (εδάφιο 1.3.2.2.).

Γ) Μέτρηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από τα μη εξατμισθέντα σωματίδια του αναλύτη (εδάφιο 1.3.2.3.).



Σχήμα 1.3.1: Σχηματική αναπαράσταση αρχής λειτουργίας τυπικού συστήματος ELSD (D_0 και D η διάμετρος των σωματιδίων του εκνεφώματος πριν και μετά την εξάτμιση αντίστοιχα).

Όλα τα εμπορικά διαθέσιμα, καθώς και τα αναφερόμενα στη βιβλιογραφία συστήματα ELSD ακολουθούν την παραπάνω γενική αρχή λειτουργίας. Παράλληλα όμως, παρουσιάζονται αρκετές διαφοροποιήσεις σε ένα ή περισσότερα τμήματα του ανιχνευτή με σκοπό τη βελτίωση των χαρακτηριστικών ποιότητάς του.

1.3.2.1. Στάδιο Εκνέφωσης

Ο σκοπός του σταδίου της εκνέφωσης είναι να μετατρέψει το έκλουσμα της αναλυτικής στήλης σε σταγονίδια με τη μικρότερη δυνατή διάμετρο. Το μικρό μέγεθος των σταγονιδίων επιτρέπει στο επόμενο στάδιο (εδάφιο 1.3.2.2.) την ταχεία και κατά το δυνατόν πλήρη εξάτμιση των συστατικών της κινητής φάσης.

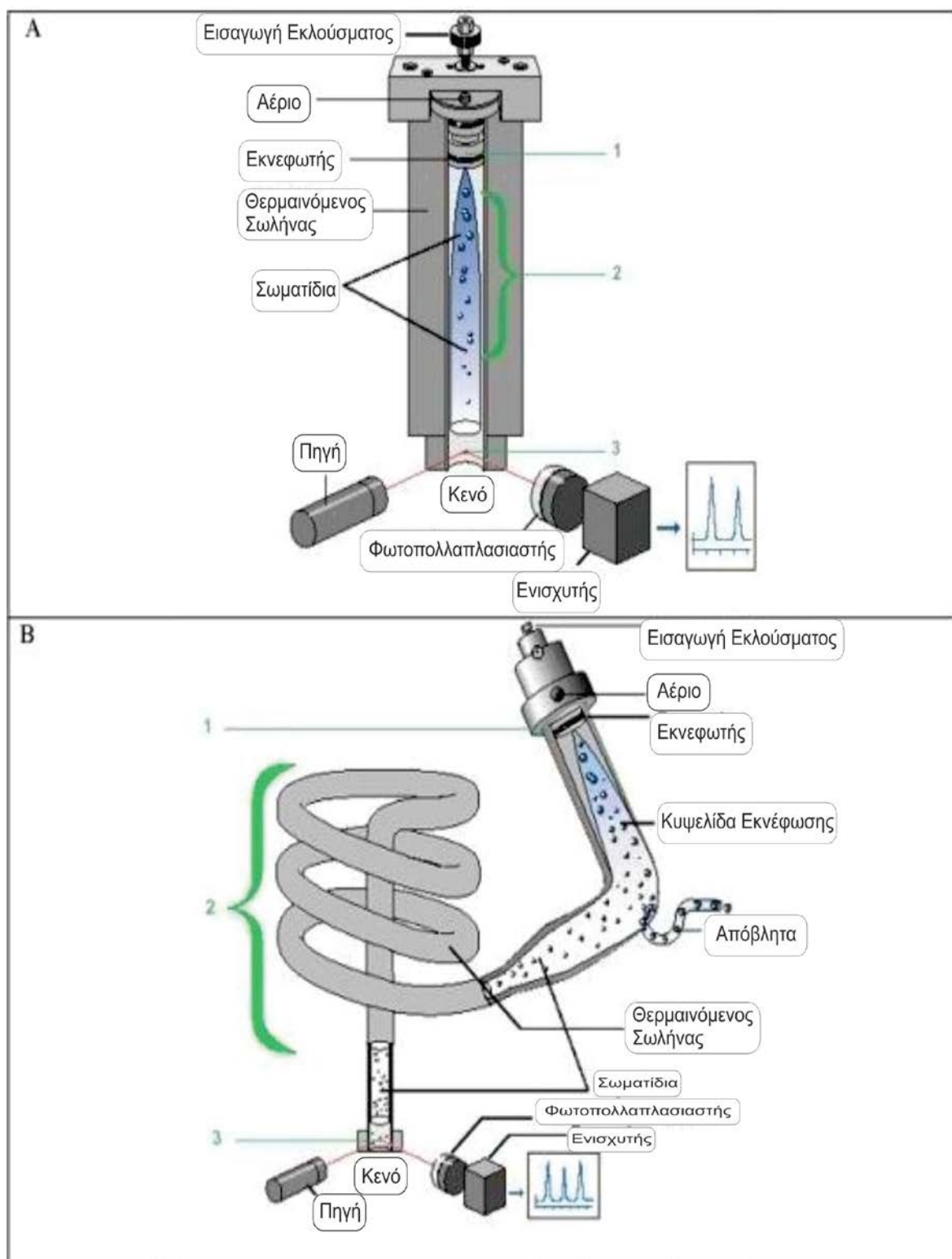
Σε όλα τα συστήματα ELSD, το στάδιο της εκνέφωσης επιτυγχάνεται με τη διέλευση του εκλούσματος από (μεταλλικό ή υάλινο) διάφραγμα κατάλληλου μεγέθους και τη ταυτόχρονη διαβίβαση αδρανούς αερίου, υπό ροή τύπου Ventouri, με κατεύθυνση αυτή της ροής του εκλούσματος. Το αέριο που διαβιβάζεται είναι στις περισσότερες περιπτώσεις άζωτο ή αέρας και αποσκοπεί, εκτός από την εκνέφωση του εκλούσματος, στη μετα-

φορά των δημιουργούμενων σταγονιδίων στο θερμαντικό θάλαμο εξάτμισης, στην κυψελίδα μέτρησης και τέλος στα απόβλητα.

Τα συστήματα ELSD χωρίζονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την κατεργασία του δημιουργούμενου εκνεφώματος:

α) Το εκνέφωμα υπάρχει δυνατότητα να οδηγηθεί άμεσα, χωρίς μεταβολή στην κατεύθυνση ροής, ποσοτικά στο θάλαμο εξάτμισης (ELSD τύπου A, Σχήμα 1.3.2α). Στην περίπτωση που οι αναλύτες είναι μη πτητικοί, η ποσοτική μεταφορά του εκνεφώματος στον θάλαμο εξάτμισης συνεπάγεται καλύτερη ανιχνευσιμότητα, δημιουργεί όμως την απαίτηση υψηλών θερμοκρασιών εξάτμισης ($>60\text{ }^{\circ}\text{C}$, μη ανίχνευση πτητικών αναλυτών), υψηλής πτητικότητας κινητή φάση (αδυναμία χρησιμοποίησης νερού) και περιορισμό στην ταχύτητα ροής ($<1\text{ mL/min}$).

β) Το εκνέφωμα οδηγείται σε έναν καμπύλο, συνήθως υάλινο σωλήνα (κυψελίδα εκνέφωσης), όπου τα μεγαλύτερα και δυσκολότερα εξατμιζόμενα σταγονίδια αερολύματος συμπυκνώνονται στα τοιχώματα του σωλήνα και οδηγούνται στα απόβλητα (ELSD τύπου B, Σχήμα 1.3.2β). Το εκνέφωμα αποκτά μικρότερη διασπορά σε ό,τι αφορά στο μέγεθος των σωματιδίων και η απαιτούμενη θερμοκρασία για την εξάτμιση της κινητής φάσης είναι χαμηλότερη. Το ποσοστό του εκλούσματος που οδηγείται στο θάλαμο εξάτμισης είναι λιγότερο από 10% για καθαρά υδατικές κινητές φάσεις και έως 100% για κινητές φάσεις αποτελούμενες από υψηλής πτητικότητας οργανικούς διαλύτες. Ο τύπος B των ανιχνευτών ELSD έχει δυνατότητα ανεξάρτητης ρύθμισης της θερμοκρασίας της κυψελίδας εκνέφωσης σε σχέση με το θάλαμο εξάτμισης. Παράλληλα, η ρύθμιση της θερμοκρασίας της κυψελίδας εκνέφωσης στα συστήματα HPLC είναι επιθυμητή, διότι έχει αποδειχθεί ότι η θερμοκρασία λειτουργίας επηρεάζει την κατανομή των μεγεθών των σωματιδίων του εκνεφώματος και επομένως την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων [Righezza, *et al.*, 1988]. Η επίδραση ωστόσο της θερμοκρασίας περιβάλλοντος στους ανιχνευτές ELSD είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με τους ανιχνευτές δείκτη διάθλασης.



Σχήμα 1.3.2: Σχηματική αναπαράσταση ανιχνευτή ELSD α) τύπου Α (άμεσης/ ποσοτικής εισαγωγής σταγονιδίων) και β) τύπου Β (διαχωρισμού σταγονιδίων).

1.3.2.2. Εξάτμιση Κινητής Φάσης

Μετά το στάδιο της εκνέφωσης, τα δημιουργούμενα σταγονίδια αερολύματος οδηγούνται υπό τη ροή του φέροντος αερίου, σε έναν κεκλιμένο, θερμαινόμενο σωλήνα. Υπό ιδανικές συνθήκες, λαμβάνει χώρα πλήρης εξάτμιση των συστατικών της κινητής φάσης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της διαμέτρου των σωματιδίων. Ως εκ τούτου τα σωματίδια, μετά το στάδιο της εξάτμισης, θα πρέπει να αποτελούνται πλέον μόνο από μόρια της υπό προσδιορισμό ουσίας.

Η θερμοκρασία εξάτμισης είναι μια κρίσιμη παράμετρος, επειδή συσχετίζεται άμεσα με την ευαισθησία και την ανιχνευσιμότητα των προσδιορισμών. Για την επιλογή της θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πτητικότητα και το υπόλειμμα εξάτμισης των συστατικών της κινητής φάσης, η θερμοκρασία διάσπασης, η πτητικότητα και η θερμοκρασία υγροποίησης των υπό προσδιορισμό ουσιών. Η βέλτιστη θερμοκρασία εξάτμισης θα είναι αυτή στην οποία επιτυγχάνεται η κατά το δυνατόν πληρέστερη εξάτμιση των συστατικών της κινητής φάσης χωρίς να υπάρχουν απώλειες της υπό προσδιορισμό ουσίας (εξάτμιση ή διάσπαση) και τα δημιουργούμενα σωματίδια να βρίσκονται στη στερεά κατάσταση [Stolyhwo, *et al.*, 1987]. Ιδιαίτερα υψηλή θερμοκρασία εξάτμισης έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί την απότομη εξάτμιση των συστατικών της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα την ακανόνιστη μεταβολή του σχήματος και της κατανομής μεγεθών των σωματιδίων. Έχει προταθεί ότι, η μέγιστη σκέδαση φωτός (μέγιστο αναλυτικό σήμα) επιτυγχάνεται όταν η κατανομή των διαμέτρων των σωματιδίων έχει τη μέγιστη μέση τιμή και τη μικρότερη απόκλιση [Orpenheimer, *et al.*, 1985].

Ο σχεδιασμός και η αρχή λειτουργίας των κεκλιμένων, θερμαινόμενων σωλήνων είναι διαφορετικά για τον τύπο Α σε σχέση με τον τύπο Β των ανιχνευτών ELSD. Στον τύπο Α (σχήμα 1.3.2α), χρησιμοποιούνται σωλήνες μικρού μήκους σε συνδυασμό με υψηλές θερμοκρασίες και προθερμαινόμενο αέριο [Guiochon, *et al.*, 1988] ή αέριο υψηλής θερμικής αγωγιμότητας. Στον τύπο Β (σχήμα 1.3.2β), κατά το στάδιο της εκνέφωσης έχουν απομακρυνθεί τα σταγονίδια αερολύματος μεγάλου μεγέθους και ως εκ τούτου η εξάτμιση των συστατικών της κινητής φάσης είναι ευκολότερη. Χρησιμοποιούνται χαμηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με τον τύπο Α, ο θερμαινόμενος σωλήνας όμως είναι μεγάλου μήκους και ελικοειδής. Οι χαμηλές θερμοκρασίες εξάτμισης επιτρέπουν τον προσδιορισμό θερμοευαίσθητων ή υψηλής πτητικότητας μορίων. Παράλληλα, οι ανιχνευτές τύπου Β έχουν μεγαλύτερη ικανότητα εξάτμισης σε σχέση με τους ανιχνευτές τύπου Α. Για παράδειγμα, οι ανιχνευτές τύπου Α δεν είναι συμβατοί με υδατικές κινητές φάσεις, ενώ οι ανιχνευτές τύπου Β έχουν ικανότητα εξάτμισης 100% υδατικής κινητής φάσης, υπό ροή 3 mL/min, στους 50 °C [Herbreteau, *et al.*, 1990].

1.3.2.3. Ανίχνευση Σκεδαζόμενης Ακτινοβολίας

Μετά το στάδιο της εξάτμισης, τα σωματίδια εισέρχονται στην οπτική κυψελίδα, όπου διέρχεται μονοχρωματική ή πολυχρωματική ακτινοβολία. Η πρόσπτωση της ακτινοβολίας στα σωματίδια προκαλεί τη σκέδασή της, η ποσότητα της οποίας μετράται από φωτοπολλαπλασιαστή ή φωτοδίοδο. Η γωνία ανίχνευσης έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει το συντελεστή απόκρισης του ανιχνευτή και τα χαρακτηριστικά ποιότητας των λαμβανόμενων αποτελεσμάτων, χωρίς όμως να έχει προταθεί μια βέλτιστη ή κοινά αποδεκτή τιμή. Το αναλυτικό σήμα, αλλά παράλληλα και ο θόρυβος αυξάνουν με μείωση της γωνίας ανίχνευσης, με εξαίρεση τη σκέδαση τύπου Mie (εδάφιο 1.3.2.3.1.), όπου παρατηρείται περίπλοκη συσχέτιση.

Δεν έχουν αναφερθεί αποδεδειγμένα πλεονεκτήματα χρησιμοποίησης μονοχρωματικής πηγής ακτινοβολίας σε σχέση με την πολυχρωματική πηγή. Η μονοχρωματική ακτινοβολία συνήθως παράγεται από δίοδο εκπομπής λέιζερ και προϋποτίθεται ότι είναι κατάλληλου μήκους κύματος έτσι, ώστε οι υπό προσδιορισμό ουσίες να μην εμφανίζουν απορρόφηση [Righezza, *et al.*, 1988].

1.3.2.3.1. Γενικά περί σκέδασης φωτός

Σκέδαση ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο το φως προσπίπτει σε ένα σύστημα σωματιδίων, απορροφάται και επανεκπέμπεται προς όλες τις κατευθύνσεις ανεξάρτητα από τη γωνία πρόσπτωσης. Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία μπορεί να έχει την ίδια συχνότητα με την προσπίπτουσα ακτινοβολία ή διαφορετική. Στην πρώτη περίπτωση η σκέδαση ονομάζεται ελαστική, ενώ στη δεύτερη ανελαστική. Η ανελαστική σκέδαση ταξινομείται στη σκέδαση Raman και στη σκέδαση Brillouin, βάσει των οποίων έχουν αναπτυχθεί ιδιαίτερα σημαντικές αναλυτικές φασματοσκοπικές τεχνικές, δεν εντάσσονται όμως στην αρχή λειτουργίας των ανιχνευτών ELSD.

Η ελαστική σκέδαση ταξινομείται σε τρεις διαφορετικούς τύπους, με κριτήριο το δείκτη διάθλασης και το μέγεθος των σωματιδίων (Πίνακας 1.3): α) Rayleigh, β) Debye και γ) Mie. Στο πεδίο μελέτης των ανιχνευτών ELSD η σκέδαση τύπου Rayleigh δεν διακρίνεται από τη σκέδαση τύπου Debye και αντιμετωπίζονται ως ένας ενιαίος τύπος.

Πίνακας 1.3: Ταξινόμηση ελαστικής σκέδασης με κριτήριο το σχετικό δείκτη διάθλασης των σωματιδίων n , και το λόγο της διαμέτρου των σωματιδίων d_s προς το μήκος κύματος της ακτινοβολίας λ .

Τύπος σκέδασης	Σχετικός Δείκτης διάθλασης n_r	Αναλογία Διαμέτρου σωματιδίων d_s – Μήκους κύματος ακτινοβολίας λ
Rayleigh	$ (n_r - 1) \ll 1$	$d_s < 0,05\lambda$
Debye	$ (n_r - 1) \approx 0,1$	$0,05\lambda < d_s < 0,1\lambda$
Mie	$ (n_r - 1) \gg 0$	$0,1\lambda < d_s < \lambda$

* $n_r = n_s/n_m$ όπου n_s και n_m ο δείκτης διάθλασης των σωματιδίων και του μέσου, αντίστοιχα.

Η ελαστική σκέδαση τύπου Rayleigh εμφανίζεται όταν τα σωματίδια αποτελούν το άθροισμα μικρού αριθμού μορίων και γενικά, δε θεωρείται ως ο τύπος σκέδασης που επικρατεί στους ανιχνευτές ELSD. Με βάση τη θεωρία Rayleigh, η πρόσπτωση ακτινοβολίας σε θεωρούμενα σημειακά σωματίδια, με πολώσιμο ηλεκτρονικό νέφος, έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά ενέργειας στο ηλεκτρονικό νέφος και την ταλάντωσή του, η οποία στη συνέχεια συνεπάγεται την εκπομπή ακτινοβολίας προς όλες τις κατευθύνσεις με συχνότητα ίση με τη συχνότητα της ακτινοβολίας πρόσπτωσης. Από κβαντομηχανική βέβαια σκοπιά, ο μηχανισμός της σκέδασης είναι ανάλογος του φθορισμού, δηλαδή λαμβάνει χώρα μεταφορά ενέργειας στο ηλεκτρονικό νέφος και μετάβαση ηλεκτρονίων σε κατάλληλα ενεργειακά επίπεδα ακολουθούμενη από την επαναφορά τους στη βασική κατάσταση, υπό εκπομπή ακτινοβολίας. Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία εμφανίζει πόλωση ανάλογα με τη γωνία παρατήρησης. Υπό γωνία 90° , η σκεδαζόμενη ακτινοβολία εμφανίζει πλήρη γραμμική πόλωση. Επίσης, η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας εξαρτάται από την πολωσιμότητα των σωματιδίων, η οποία είναι ανάλογη της διαμέτρου τους. Αποδεικνύεται ότι η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι ανάλογη της έκτης δύναμης του λόγου της διαμέτρου των σωματιδίων προς το μήκος κύματος [Kerker, 1969].

Στην σκέδαση τύπου Mie, τα σωματίδια δε θεωρούνται πλέον ως σημειακές πηγές, αλλά ως ένα άθροισμα σημείων και οι ακτινοβολίες που εκπέμπονται μπορούν να συμβάλουν. Ως εκ τούτου, η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας εξαρτάται από τη γωνία παρατήρησης και παράλληλα αποδεικνύεται ότι εξαρτάται από το δείκτη διάθλασης των σωματιδίων και είναι ανάλογη της τέταρτης δύναμης του λόγου της διαμέτρου των σωματιδίων προς το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Για τιμές του σχετικού δείκτη διάθλασης των σωματιδίων και του λόγου της διαμέτρου προς το μήκος κύματος μεγαλύτερες της μονάδας (Πίνακας 1.3), παρατηρείται το φαινόμενο της ανάκλασης και διάθλασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Το άθροισμα της έντασης της διαθλώμενης και της ανακλώμενης ακτινοβολίας είναι ίσο με την ένταση

της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η σχετική ένταση της ανακλώμενης ακτινοβολίας R_A δίνεται από τον τύπο:

$$R_A = \frac{1}{2} \left[\frac{\sin^2(\theta_i - \theta_r)}{\sin^2(\theta_i + \theta_r)} + \frac{\tan^2(\theta_i - \theta_r)}{\tan^2(\theta_i + \theta_r)} \right] \quad (1.4)$$

όπου θ_i και θ_r η γωνία της πρόσπτωσης και διάθλασης, αντίστοιχα. Από τη σχέση (1.4) και εφόσον είναι γνωστός ο δείκτης διάθλασης των σωματιδίων και η γωνία ανίχνευσης, μπορεί να υπολογιστεί το ποσοστό της ανακλώμενης σε σχέση με τη διαθλώμενη ακτινοβολία. Επισημαίνεται ότι η ένταση της διαθλώμενης ακτινοβολίας αναμένεται να εξαρτάται από το δείκτη διάθλασης των ουσιών.

1.3.2.3.2. Απόκριση του ανιχνευτή και ποσοτικοποίηση

Παρόλο που η απόκριση του ανιχνευτή εξαρτάται από το μηχανισμό σκέδασης, για ένα ευρύ φάσμα υπό προσδιορισμό ουσιών και συγκεντρώσεων, το εμβαδόν των χρωματογραφικών κορυφών A μπορεί να συσχετισθεί με τη συγκέντρωση μάζας του αναλύτη m με εκθετική σχέση [Asmus, *et al.*, 1984]:

$$A = am^b \quad (1.5)$$

όπου a και b είναι συντελεστές που εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως η φύση και η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης. Οι αναφερόμενες στη βιβλιογραφία τιμές του συντελεστή b μπορεί να κυμαίνονται μεταξύ 0,9 και 2. Όσο πλησιέστερα προς τη μονάδα είναι η τιμή του b τόσο μικρότερη είναι η απόκλιση της σχέσης (1.5) από το γραμμικό μοντέλο. Ως εκ τούτου, για να ακολουθεί μια γραμμική τάση, οι καμπύλες βαθμονόμησης θα πρέπει να σχεδιάζονται με διπλά λογαριθμικές συντεταγμένες:

$$\log A = b \log m + \log a \quad (1.6)$$

Εκτός από την εκθετική συσχέτιση του εμβαδού των χρωματογραφικών κορυφών με τη συγκέντρωση μάζας του αναλύτη, έχουν προταθεί, σε περιορισμένο αριθμό εφαρμογών, και πολυωνυμικές συσχετίσεις δευτέρου ή τρίτου βαθμού [Li, *et al.*, 2001].

1.3.3. Εφαρμογές

Εξαιτίας των υψηλών ορίων ανίχνευσης και της χρησιμοποιούμενης σχετικά υψηλής θερμοκρασίας εξάτμισης, η οποία έθετε σημαντικό περιορισμό στην πτητικότητα και τη θερμική σταθερότητα των αναλυτών, οι αναλυτικές εφαρμογές των ανιχνευτών ELSD μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1990 ήταν ελάχιστες. Ως εκ τούτου, οι ανιχνευτές ELSD αποτελούσαν ουσιαστικά μία εναλλακτική λύση των ανιχνευτών δείκτη διάθλασης, χωρίς όμως να είναι ευρέως διαδεδομένοι και να παρέχουν ποιοτικώς καλύτερα αποτελέσματα.

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 μέχρι σήμερα, παρατηρείται μια ραγδαία αύξηση των δημοσιευόμενων στη διεθνή βιβλιογραφία εφαρμογών, ως αποτέλεσμα τριών πολύ σημαντικών εξελίξεων: α) σημαντικής βελτίωσης της τεχνολογικής σχεδίασης των ανιχνευτών ELSD, β) ανάπτυξης της τεχνικής της εξάτμισης χαμηλής θερμοκρασίας (low temperature evaporation) και γ) διευκρίνισης των αρχών λειτουργίας του ανιχνευτή και εξάρτησης του αναλυτικού σήματος από τους διάφορους παράγοντες. Σήμερα, υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός εμπορικά διαθέσιμων συστημάτων ανίχνευσης ELSD και ένα δυναμικά αναπτυσσόμενο πεδίο εφαρμογών σε τομείς όπως η ανάλυση τροφίμων, φαρμάκων, βιολογικών δειγμάτων, φυσικών προϊόντων και δειγμάτων βιομηχανικής σημασίας. Ορισμένες ενδεικτικές εφαρμογές είναι οι εξής:

Στον τομέα της ανάλυσης τροφίμων έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για τον προσδιορισμό τριγλυκεριδίων σε διάφορους τύπους ελαίων [Letter, 1993], φωσφατιδυλοχολίνης, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης και σφιγγομυελίνης σε βρώσιμα έλαια [Abidi, *et al.*, 1997], β-καροτενίου, βιταμίνης Α και πολυεστέρων της σακχαρόζης σε μαργαρίνες [Chase, *et al.*, 1995], μη πτητικών συστατικών σογιέλαιου [Abidi, *et al.*, 1999], υδατανθράκων σε ποτά [Wei, *et al.*, 2000], γάλα σκόνη, μέλι, καραμέλες και χυμούς [Wei, *et al.*, 2002], κ.α.

Στον τομέα των φυσικών προϊόντων έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για τον προσδιορισμό σακχάρων σε καπνό και φυτικούς ιστούς [Clement, *et al.*, 1992], φυτικού οξέος σε ρίζες και βολβούς [Phillippy, *et al.*, 2002], φυτοστερολών σε διάφορα φυτά [Breinhölder, *et al.*, 2002], κύριων συστατικών της *Ginkgo biloba* [van Beek, 2002], μαλτοδεξτρινών σε φυτικά εκχυλίσματα [Guenou, *et al.*, 2000] κ.α.

Στον τομέα της φαρμακευτικής ανάλυσης έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για τον προσδιορισμό ανόργανων ιόντων σε φαρμακευτικά σκευάσματα [Risley, *et al.*, 1995], αμινοξέων [Chaimbault, *et al.*, 1999], μουπυροκίνης σε αλοιφές με βάση την πολυαιθυλενογλυκόλη [Porter, *et al.*, 1996], σάρωσης (screening) βιολογικών υγρών [Criado, *et al.*, 2001], ιβουπροφαίνιου και υδροξυπροπυλομεθυλο κελλουλόζης [Whelan, *et al.*, 2002], συστατικών ρίζας του ζιγγιβέρεως (ginseng) [Kwon, *et al.*, 2001] κ.α.

1.4. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

1.4.1. Εισαγωγή

Τα επίπεδα των οργανικών ενώσεων και συγκεκριμένα των σακχάρων στο περιβάλλον είναι συνήθως της τάξεως των $\mu\text{g L}^{-1}$ ή $\mu\text{g Kg}^{-1}$. Αυτό οφείλεται εν μέρει και στα πολύ χαμηλά ανώτερα επιτρεπτά όρια που θεσπίζονται από τους αρμόδιους φορείς αναφορικά με την παρουσία των ρύπων στα διάφορα υποστρώματα και είναι επίσης της ίδιας τάξης μεγέθους. Επομένως οι τεχνικές προκατεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται, θα πρέπει να παρουσιάζουν τη μέγιστη δυνατή απόδοση, ώστε να είναι εφικτή η ανίχνευση και η παρακολούθηση τόσο χαμηλών επιπέδων συγκέντρωσης ευρέος φάσματος ουσιών διαφόρων χημικών κατηγοριών.

Η προκατεργασία των δειγμάτων αποτελεί βασικό στάδιο της συνολικής ανάλυσης. Σκοπός της είναι η λήψη κλασμάτων, τα οποία είναι εμπλουτισμένα με όλες τις ουσίες-στόχους, αλλά απαλλαγμένα από τυχόν προσμίξεις του υποστρώματος που παρεμποδίζουν την περαιτέρω ανάλυση και συμβατά με τη μέθοδο HPLC. Αρχικά πραγματοποιείται η προετοιμασία των δειγμάτων ανάλογα με τη φύση του υποστρώματος και μετά ακολουθεί η προκατεργασία η οποία αποτελείται ουσιαστικά από τρία βασικά βήματα: α) την απομόνωση των ουσιών-στόχων από το υπόστρωμα μέσω εκχύλισης, β) τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων από προσμίξεις του υποστρώματος, αλλά και από ουσίες που δεν αποτελούν στόχο, και γ) την προσυγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ουσιών ή την παραγωγοποίησή τους για βελτιωμένη ανίχνευση ή καλύτερο διαχωρισμό.

Η προκατεργασία του δείγματος ξεκινάει με τη συλλογή του δείγματος και επεκτείνεται μέχρι την έγχυσή του στο χρωματογραφικό σύστημα. Περιλαμβάνει τα στάδια της μεταφοράς, συντήρησης, προκαταρκτικής προκατεργασίας, εργαστηριακής δειγματοληψίας και αλληλοδιάδοχες ζυγίσεις και αραιώσεις. Αν και η HPLC είναι κατεξοχήν αυτοματοποιημένη διαδικασία, συνήθως η προκατεργασία του δείγματος γίνεται με το χέρι.

Πολλές φορές, η προκατεργασία του δείγματος μπορεί να απαιτήσει περισσότερο χρόνο σε σύγκριση με το διαχωρισμό στην HPLC και την επεξεργασία των δεδομένων. Επιπλέον, συνήθως περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό μεθοδολογιών και πολλαπλά στάδια έτσι ώστε να αποτελεί ένα ιδιαίτερης σημασίας τμήμα της ανάπτυξης μιας χρωματογραφικής μεθόδου. Τέλος, η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα μιας μεθόδου συχνά καθορίζονται από τη διαδικασία προκατεργασίας του δείγματος. Για όλους αυτούς τους λόγους, η ανάπτυξη της διαδικασίας της προκατεργασίας του δείγματος επιβάλλει προσεκτικά μελετημένο προγραμματισμό. Επίσης, η *ανάκτηση* των προσδιοριζόμενων συστατικών κατά την

προκατεργασία του δείγματος θα πρέπει να είναι *ποσοτική*, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία της μεθόδου.

Επιδιώκεται, λοιπόν, ο ελάχιστος αριθμός των σταδίων και η πιθανή αυτοματοποίηση της διαδικασίας της προκατεργασίας του δείγματος. Έτσι, μειώνεται ο συνολικά απαιτούμενος χρόνος, κόπος και οι πιθανότητες σφαλμάτων του αναλυτή. Η αυτοματοποίηση μιας διαδικασίας προκατεργασίας δείγματος μπορεί να είναι αυξημένου αρχικού κόστους και πολυπλοκότητας, μπορεί όμως λόγω του μεγάλου αριθμού δειγμάτων ή της αποφυγής της έκθεσης σε τοξικές ουσίες να αποβεί συμφέρουσα κατά την εφαρμογή της ως μεθόδου ρουτίνας.

1.4.2. Προκατεργασία δειγμάτων αερολύματος

Η τεχνική της προκατεργασίας του δείγματος ποικίλει ανάλογα με τη μέθοδο διαχωρισμού. Τα κριτήρια επιλογής μιας τεχνικής προκατεργασίας αφορούν κυρίως τη φυσική κατάσταση του δείγματος (στερεή, υγρή ή αέρια), το βαθμό εκλεκτικότητας, απόδοσης και χρόνου του σταδίου προκατεργασίας και τέλος τη διαχωριστική τεχνική που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί.

Τα αέρια δείγματα συνήθως αναλύονται με αέρια χρωματογραφία παρά με HPLC. Όμως, αέρια ευαίσθητα δείγματα, θερμικά ασταθή, ή δείγματα που έχουν τάση προσρόφησης σε μεταλλικές επιφάνειες, μερικές φορές αναλύονται καλύτερα με HPLC. Στην περίπτωση αυτή απαιτείται η χρησιμοποίηση παγίδας για τον "εγκλωβισμό" των προσδιοριζόμενων ουσιών. Το αέριο δείγμα είτε α) περνά μέσα από ένα στερεό υπόστρωμα και εν συνεχεία εκλύεται μ' ένα κατάλληλο διαλύτη, είτε β) διοχετεύεται υπό μορφή φουσαλίδων μέσα σε ένα υγρό που παγιδεύει τον αναλύτη (παράδειγμα ανάλυσης αερίου δείγματος με HPLC είναι ο προσδιορισμός πτητικών καρβονυλικών ενώσεων).

1.4.2.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Οι υπό προσδιορισμό ουσίες του αερολύματος εγκλωβίζονται σε στερεό υπόστρωμα όπου το αέριο δείγμα περνά μέσα από σωλήνα με προσροφητικό (π.χ. φίλτρο υάλου ή χαλαζία) με την βοήθεια αντλίας. Στη συνέχεια, οι εγκλωβισμένοι αναλύτες εκλύονται με ισχυρό διαλύτη. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που οι αναλύτες δεν απομακρύνονται εύκολα από τη στερεά μήτρα, λόγω εγκλεισμού, οπότε και απαιτούνται πιο "ισχυρές" τεχνικές, όπως υπέρηχοι ή υγρή-στερεή εκχύλιση.

1.4.2.2. Υγρή-στερεή εκχύλιση

Η απομόνωση των διαφόρων ρύπων από τα στερεά υποστρώματα πραγματοποιείται συνήθως με μια τεχνική υγρή-στερεής εκχύλισης, όπως η εκχύλιση ανάδευσης και η εκχύλιση με χρήση υπερήχων.

1.4.2.2.1. Εκχύλιση με ανάδευση

Η *εκχύλιση με ανάδευση* αποτελεί ίσως την απλούστερη και πιο παραδοσιακή μέθοδο εκχύλισης δειγμάτων από στερεό υπόστρωμα. Κατάλληλη ποσότητα δείγματος τοποθετείται σε ένα γυάλινο δοχείο, προστίθεται ο διαλύτης εκχύλισης και το δοχείο αναδεύεται είτε μηχανικά είτε χειροκίνητα για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Μετά την εκχύλιση, ο διαλύτης στον οποίο περιέχονται οι ουσίες διαχωρίζεται από το υπόστρωμα με διήθηση ή φιλτράρισμα. Σχεδόν πάντα η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές και τα συνολικά εκχυλίσματα διηθούνται ή φιλτράρονται. Αυτό συμβαίνει ώστε κάθε φορά φρέσκος διαλύτης να είναι σε επαφή με το δείγμα αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την απόδοση της μεθόδου.

1.4.2.2.2. Εκχύλιση με χρήση υπερήχων

Η *εκχύλιση με διαλύτη υποβοηθούμενη από υπερήχους*, είναι μια σημαντική μεθοδολογία εκχύλισης, λόγω του χαμηλού κόστους της, τόσο σε εργαστηριακή όσο και σε βιομηχανική κλίμακα. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή το δείγμα, το οποίο είναι βυθισμένο μέσα σε διαλύτη, αναταράσσεται με τη βοήθεια υπερήχων για συγκεκριμένο χρόνο. Οι υπό προσδιορισμό ουσίες περνούν από τη στερεή φάση του υποστρώματος του δείγματος στην υγρή φάση του διαλύτη λόγω της ανατάραξης. Ένας πιθανός μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο πραγματοποιείται η εκχύλιση με υπερήχους είναι αυτός της ενισχυμένης μεταφοράς μάζας, δηλαδή της αυξημένης διείσδυσης του διαλύτη στους πόρους του φίλτρου του υποστρώματος με αποτέλεσμα τον “απεγκλωβισμό” των υπό προσδιορισμό ουσιών από το υπόστρωμα του φίλτρου στον διαλύτη. Επιπλέον, οι υπέρηχοι διευκολύνουν, τη διόγκωση και την επιδιαλύτωση του υποστρώματος προκαλώντας διόγκωση των πόρων. Η αποτελεσματικότερη διόγκωση βελτιώνει και το ρυθμό μεταφοράς της μάζας και σε κάποιες περιπτώσεις συντελεί στην καταστροφή του υποστρώματος-φίλτρου, προκαλώντας έτσι αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης ή/και μείωση του απαιτούμενου χρόνου. Η πα-

ραπάνω διαδικασία συνήθως πραγματοποιείται εις τριπλούν και τα τελικά εκχυλίσματα συνδυάζονται και φιλτράρονται, ώστε να διαχωριστεί ο διαλύτης και το υπόστρωμα. Ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη ώστε να μειωθεί ο όγκος του. Άλλα πλεονεκτήματα της τεχνικής είναι η υψηλή επαναληπτικότητα και η δυνατότητα χρήσης δειγμάτων διαφορετικών μεγεθών.

1.4.2.3. Εκχύλιση και τεχνολογίες μεμβράνης

Στην τεχνική της *εκχύλισης μεμβράνης* (membrane extraction), η μεμβράνη δρα ως φίλτρο στο οποίο δεσμεύονται εκλεκτικά τα μόρια της ένωσης ή γίνεται μεταφορά της ένωσης από το δείγμα (δότης) σε ένα διάλυμα (δέκτης) λόγω του φαινομένου της διάχυσης [Jönsson, *et al.*, 2001].

Η εκχύλιση μεμβράνης χρησιμοποιείται για την προκατεργασία αέριων δειγμάτων και πτητικών ουσιών. Στην περίπτωση αυτή το δείγμα ακινητοποιείται με την βοήθεια μιας αντλίας στην περιοχή της μεμβράνης, όπου στη συνέχεια τα πτητικά συστατικά τη διαπερνούν και εισέρχονται στο διάλυμα του δέκτη.

Στο πεδίο της βιοανάλυσης χρησιμοποιείται κυρίως η μικροδιαπίδυση. Στην περίπτωση αυτή, ο διαχωρισμός της ένωσης από το υπόστρωμα του δείγματος γίνεται με βάση το μέγεθος των μορίων. Τα μικρού μεγέθους μόρια διαπερνούν την ημιπερατή μεμβράνη και εισέρχονται στο διάλυμα του δέκτη, ενώ τα μεγαλύτερα παραμένουν στο δείγμα. Η τεχνική της μικροδιαπίδυσης βρίσκει μεγάλη εφαρμογή σε *in vivo* αναλύσεις, όπου η προσδιοριζόμενη ένωση μετράται με συνεχή ρυθμό στον οργανισμό [Niwa, *et al.*, 1992]. Επίσης χρησιμοποιείται για την απομόνωση φαρμάκων από υπόστρωμα μεγαλομορίων και στην απομάκρυνση DNA, ολιγονουκλεοτιδίων και πρωτεϊνών από βιοπολυμερή.

Ένα άλλο είδος τεχνικής προκατεργασίας δείγματος είναι η ηλεκτροδιαπίδυση. Η αρχή λειτουργίας της είναι η ίδια με εκείνη της εκχύλισης μεμβράνης, με τη διαφορά ότι εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού στο ρεύμα του δέκτη. Έτσι, οι φορτισμένες ενώσεις διαπερνούν τη μεμβράνη και οδεύουν προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο. Βασικό πλεονέκτημα της τεχνικής είναι ότι, περιορίζει στο ελάχιστο τη διαδικασία επαναδιάχυσης της ένωσης προς το δείγμα.

1.4.2.4. Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης

Μία ακόμη τεχνική που εφαρμόζεται σε αέρια δείγματα και παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον είναι η *μικροεκχύλιση στερεάς φάσης* (solid phase micro extraction, SPME). Η τεχνική αυτή βασίζεται σε μια διαδικασία δύο σταδίων: α) οι προσδιοριζόμενες ενώσεις προσροφούνται σε μια λεπτή ίνα από τηγμένη πυριτία (SiO_2) η οποία είναι εμβαπτισμένη στο διάλυμα του δείγματος και β) οι ενώσεις εκροφώνται είτε με την τοποθέτηση της ίνας σε οργανικό διαλύτη είτε με θέρμανση. Επίσης, η προσρόφηση είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί και από τον αέριο υπερκείμενο χώρο όταν πρόκειται για πτητικές ή αέριες ενώσεις. Η απλότητα, η ευκολία, η μικρή κατανάλωση οργανικών διαλυτών και ο μικρός όγκος δείγματος είναι τα κύρια χαρακτηριστικά της τεχνικής αυτής. Ως υλικά επικάλυψης της ίνας χρησιμοποιούνται κυρίως μη-πολικά πολυμερή (πολύ-διμεθυλοσιλοξάνιο, PDMS), ημι-πολικό συμπολυμερές (πολυ-διμεθυλοσιλοξάνιο-διβινυλοβενζόλιο, PDMS-DVB) ή πολικό πολυμερές (πολυακρυλαμίδιο, PA).

1.4.2.5. Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μαγνητικά υλικά

Τα τελευταία χρόνια η νανοτεχνολογία έχει γίνει ένα από τα πλέον καινοτόμα πεδία στην αναλυτική χημεία. Οι μοναδικές ιδιότητες των υλικών μικροκλίμακας προσφέρουν εξαιρετικές προοπτικές για το σχεδιασμό νέων μεθόδων στη χημική ανάλυση. Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν επικεντρωθεί στην εφαρμογή διαφόρων μεγέθους προσροφητικών όπως νανοσωματίδια (NPs).

Τα σωματίδια μαγνητίτη (Fe_3O_4) αντιπροσωπεύουν μια από τις πιο συναρπαστικές προοπτικές στην αναλυτική νανοτεχνολογία, σε ότι αφορά τη διαδικασία επεξεργασίας του δείγματος, δεδομένου ότι με τα διάφορα υλικά επίστρωσής τους αποκτούν τις επιθυμητές ιδιότητες για την εκχύλιση των αναλυτών στόχου (target analytes) από υδατικά δείγματα και μπορούν εύκολα να απομονωθούν από τη μήτρα με την εφαρμογή ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου χωρίς πρόσθετη φυγοκέντρηση ή διήθηση των δειγμάτων. Έτσι, οι αναλύτες μπορούν να διαχωριστούν γρήγορα από υδατικά δείγματα και αυτή η μαγνητική μέθοδος διαχωρισμού αποδεικνύεται πιο εύχρηστη από την SPE ή την SPME. Λαμβάνοντας δε υπόψη το υψηλό κόστος της ίνας στην SPME, τα μαγνητικά (νανο)σωματίδια αποτελούν την καλύτερη επιλογή ώστε να επιτευχθεί σε ένα στάδιο η εκχύλιση, ο καθαρισμός και η προσυγκέντρωση των αναλυτών στόχου (target analytes).

Τα κύρια πλεονεκτήματα έναντι της παραδοσιακής εκχύλισης στερεάς φάσης σε προσροφητικά βασίζονται στις μεγάλες επιφάνειες εκχύλισης (προσφέρουν μια σημαντικά

υψηλότερη αναλογία εμβαδού επιφάνειας προς όγκο) που υπόσχονται πολύ μεγαλύτερη απόδοση εκχύλισης, τη χρήση μικρών ποσοτήτων δείγματος και τοξικών οργανικών διαλυτών. Επίσης, εμφανίζουν ισχυρές υπερπαραμαγνητικές (superparamagnetic) ιδιότητες που ικανοποιούν την ανάγκη της ταχείας εκχύλισης μεγάλων όγκων δείγματος με την χρησιμοποίηση ενός ισχυρού εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Για την περαιτέρω αύξηση της ικανότητας εκχύλισης και διασποράς των σωματιδίων, οι επιφάνειές τους μπορούν να τροποποιηθούν με ειδικές λειτουργικές ομάδες ώστε να επιτευχθεί εκλεκτική εκχύλιση του δείγματος. Έτσι, NPs με διάφορες ομάδες με διαφορετικές ιδιότητες συντίθενται και εφαρμόζονται για το διαχωρισμό των αναλυτών στόχου [Chen, *et al.*, 2005, Zeng, *et al.*, 2012, Zhang, *et al.*, 2010]. Επιπλέον, τα μαγνητικά σωματίδια παρουσιάζουν τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησής τους για αρκετές εκχυλίσεις.

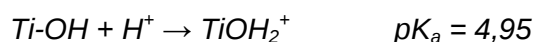
Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι ηλεκτρικές, οπτικές και μαγνητικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων εξαρτώνται ιδιαίτερα από το μέγεθος τους, η σύνθεση των διασκορπισμένων νανοσωματιδίων είναι καίριας σημασίας. Ωστόσο, θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα καθαρά ανόργανα νανοσωματίδια είναι εύκολο να σχηματίσουν μεγάλα συσσωματώματα, μεταβάλλοντας τις μαγνητικές τους ιδιότητες. Συνεπώς, η τροποποίηση αυτών των μαγνητικών νανοσωματιδίων με μία κατάλληλη επίστρωση έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας από τους πιο αποτελεσματικούς τρόπους σταθεροποίησής τους. Πρόσφατα, νανοσωματίδια Fe_3O_4 επικαλυμμένα με σιλάνια που έχουν διαφορετικές χαρακτηριστικές ομάδες τερματισμού έχουν χρησιμοποιηθεί και για να αυξήσουν τη σταθερότητα των νανο-υλικών όσον αφορά την συσσωμάτωση και για να τα κρατήσουν καλά διασπαρμένα σε υδατικά μέσα. Νανοσωματίδια Fe_3O_4 επικαλυμμένα με δεκαοκτυλοσιλάνιο, κ-δεκαοκτυλο-φωσφονικό οξύ και άνθρακα έχουν προταθεί για την ανάλυση των οιστρογόνων, PAHs, φθαλικών εστέρων και εργοστερολών σε περιβαλλοντικά δείγματα [Bianchi, *et al.*, 2012].

Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους που αναφέρθηκαν, η προτεινόμενη μέθοδος εκχύλισης επιταχύνει την πορεία της ανάλυσης (ο συνολικός χρόνος ανάλυσης είναι περίπου 10 λεπτά) και παρουσιάζει χαμηλότερα LOD σε σύγκριση με τις περισσότερες από τις άλλες μεθόδους που αναφέρθηκαν. Η νέα αυτή, απλή, ταχεία, ευαίσθητη και περιβαλλοντικά φιλική μέθοδος εκχύλισης, χρησιμοποιώντας (νανο)σωματίδια μαγνητική ως στερεή φάση εκχύλισης, είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για εργαστηριακές αναλύσεις ρουτίνας και θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση των αυτοματοποιημένων συστημάτων εκχύλισης για διάφορους αναλυτικούς σκοπούς.

1.4.2.6. Ο ρόλος της τιτανίας στην κατακράτηση των σακχάρων

Η τιτανία (TiO_2) είναι ένα οξειδίο μετάλλου (Ti) που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον κυρίως ως πληρωτικό υλικό στηλών στην υγρή χρωματογραφία, ενώ παρουσιάζει αυξημένη μηχανική, θερμική και χημική σταθερότητα. Μερικές από τις βασικές ιδιότητες της τιτανίας είναι η σταθερότητα σε υδατικά περιβάλλοντα καθώς και η ανθεκτικότητα σε όξινα και αλκαλικά διαλύματα. Επίσης, η τιτανία είναι οικονομικό υλικό, ανακυκλώσιμο και επαναχρησιμοποιήσιμο.

Γενικά, η τιτανία έχει επαμφοτερίζοντα χαρακτήρα και μπορεί να δράσει τόσο ως οξύ όσο και ως βάση κατά Brønsted-Lorry (δότης ή δέκτης υδρογονοκατιόντων H^+), με αποτέλεσμα να ενυδατώνεται πολύ εύκολα. Το προσροφημένο νερό διασπάται με το υδροξύλιο να σχηματίζει βασικές ομάδες Ti-OH και το πρωτόνιο όξινες $\text{Ti-OH}^+-\text{Ti}$. Όταν το H^+ αντικαθίσταται από κάποιο προσροφούμενο μόριο (π.χ. σάκχαρα) τότε εμφανίζεται ο όξινος χαρακτήρας.



Το ισοηλεκτρικό σημείο του TiO_2 βρίσκεται λοιπόν σε $\text{pH} = \frac{1}{2} (4,95 + 7,8) = 6,4$. Κατά συνέπεια, η επιφάνεια του TiO_2 σε $\text{pH} < 6,4$ είναι θετικά φορτισμένη λόγω της πρωτονίωσης των επιφανειακών υδροξυλίων. Συνεπώς, τα υλικά της τιτανίας ανταλλάσσουν ιόντα με φορτισμένες ομάδες αλλά και υποκαταστάτες με ισχυρές βάσεις κατά Lewis λόγω της παρουσίας όξινων θέσεων (Ti^{4+}) στην επιφάνεια της τιτανίας. Αν και η τιτανία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο εύρος pH η εφαρμογή της στο χρωματογραφικό διαχωρισμό είναι περιορισμένη [Xu, *et al.*, 2011].

Στις περισσότερες εφαρμογές η τιτανία χρησιμοποιείται για την εκλεκτική προσρόφηση αναλυτών, σπανιότερα δε των σακχάρων. Έχει αποδειχθεί ότι ο μηχανισμός κατακράτησης των μονοσακχαριτών στην τιτανία περιλαμβάνει ανταλλαγή υποκαταστατών σχηματίζοντας δεσμούς μεταξύ ενός ιόντος τιτανίου, ενός ατόμου οξυγόνου υδροξυλίου και ενός ατόμου οξυγόνου του δακτυλίου των σακχάρων [Tani, *et al.*, 2003]. Διαπιστώθηκε, λοιπόν, ότι οι υδροξυλομάδες των σακχάρων σε *όρθο* θέση ενδέχεται να έχουν παρόμοια αλληλεπίδραση ανταλλαγής υποκαταστάτη με την τιτανία σχηματίζοντας ένα χηλικό δακτύλιο. Η ισχυρή αυτή αλληλεπίδραση ανταλλαγής υποκαταστάτη έχει ως αποτέλεσμα την ισχυρή κατακράτηση των σακχάρων στην τιτανία.

Σε μεθόδους SPE που βασίζονται στα μαγνητικά νανοσωματίδια, τα ενεργοποιημένα μαγνητικά (νανο)υλικά διασπείρονται μέσα στα δείγματα για να προσροφήσουν τους

αναλύτες. Έπειτα, τα προσροφητικά υλικά διαχωρίζονται εύκολα και γρήγορα από το διάλυμα με ένα μαγνήτη και οι προσροφημένοι αναλύτες εκλύονται με τον κατάλληλο διαλύτη, αποφεύγοντας έτσι τη χρονοβόρα διαδικασία της διέλευσης των δειγμάτων διαμέσου της στήλης. Έτσι, μια επίστρωση TiO_2 επάνω σε μαγνητικά νανοσωματίδια, ύστερα από σιλιανοποίηση για τη σταθεροποίησή τους, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$, είναι μια πολύ καλή επιλογή για την εκλεκτική εκχύλιση των σακχάρων και τον ταυτόχρονο καθαρισμό του δείγματος. Η μέθοδος αυτή είναι απλή, γρήγορη και περιβαλλοντικά φιλική αφού τα μαγνητικά υλικά εκχύλισης δίνουν τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησής τους ως στερεή φάση εκχύλισης.

1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού σακχάρων σε δείγματα αερολύματος με HILIC και ανιχνευτή σκεδασμού φωτός. Τα σάκχαρα για τα οποία αναπτύχθηκε η αναλυτική μέθοδος είναι τα ακόλουθα: μαννοζάνη, λεβογλυκοζάνη, ερυθριτόλη, ξυλιτόλη, αραβιτόλη, μαννόζη, μαννιτόλη, ινοσιτόλη και σακχαρόζη. Η τιτανία, η οποία συντέθηκε ακινητοποιημένη σε μαγνητίτη, προσφέρει τη δυνατότητα για καθαρισμό και προσυγκέντρωση του δείγματος αερολύματος.

Στο επόμενο μέρος της εργασίας μελετάται η χρωματογραφική συμπεριφορά των παραπάνω σακχάρων σε δύο διαφορετικές στατικές φάσεις, μεταβάλλοντας κρίσιμες χρωματογραφικές παραμέτρους όπως είναι η ισχύς του διαλύτη έκλουσης, η συγκέντρωση του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος, η φύση του ρυθμιστικού παράγοντα, το pH της κινητής φάσης, η θερμοκρασία της στήλης και οι παράμετροι του ανιχνευτή. Με βάση τα πειραματικά αυτά δεδομένα γίνεται επιλογή της καταλληλότερης κινητής φάσης αλλά και βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών της ανάλυσης.

Τέλος, η αναπτυχθείσα μέθοδος HILIC σε συνδυασμό με μαγνητικό υλικό τιτανίας εφαρμόζεται στην ανίχνευση σακχάρων σε αερόλυμα, που συλλέχθηκε κατά τη διάρκεια της καλοκαιρινής περιόδου από το κέντρο των Ιωαννίνων.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στο μέρος αυτό παρατίθενται αναλυτικά τα αντιδραστήρια, η προετοιμασία των κινητών φάσεων και των διαλυμάτων παρακαταθήκης, τα σκεύη και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Επίσης, περιγράφονται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά των στατικών φάσεων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η παρασκευή των νανο-υλικών και προκατεργασία του δείγματος.

2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΔΙΑΛΥΤΕΣ – ΥΛΙΚΑ

Τα αντιδραστήρια, οι διαλύτες και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι τα ακόλουθα:

2.1.1. Αντιδραστήρια - Διαλύτες

- ❖ Μαννοζάνη (99%, w/w)
- ❖ Λεβογλυκοζάνη (99%, w/w) (Aldrich, Steinheim, Germany)
- ❖ *meso*-Ερυθριτόλη ($\geq 99\%$, w/w) (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- ❖ Ξυλιτόλη ($\geq 99\%$, w/w) (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- ❖ L-(-)-Αραβιτόλη (98%, w/w) (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- ❖ D-Μαννόζη ($\geq 99\%$, w/w, for microbiology, HPLC) (Fluka Chemie, Buchs SG, Switzerland)
- ❖ D-Μαννιτόλη ($\geq 98\%$, w/w) (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- ❖ Ινοσιτόλη ($\geq 99\%$, w/w) (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- ❖ Σακχαρόζη ($\geq 99,5\%$, w/w, HPLC) (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- ❖ Μυρμηκικό αμμώνιο (97%, w/w) (Aldrich, Steinheim, Germany)
- ❖ Μυρμηκικό οξύ (98-100%, w/w, p.a.) (Scharlau, Barcelona, Spain)
- ❖ Ακετονιτρίλιο (ACN) (HPLC-grade, 99,9%) (Fisher Scientific, Leicester, UK)
- ❖ Αιθανόλη (EtOH) (99,9%) (Lab-Scan, Dublin, Ireland)
- ❖ Ισοπροπανόλη (IPA) (99,9%) (Lab-Scan, Dublin, Ireland)
- ❖ Αμμωνία (25%, v/v, p.a.) (Merck, Darmstadt, Germany)
- ❖ Τετρααιθοξυ σιλάνιο (TEOS) (99%) (Aldrich, Sigma–Aldrich Ltd., Greece)
- ❖ Ισοπροποξείδιο του τιτανίου (99,99%) (Aldrich, Sigma–Aldrich Ltd., Greece)
- ❖ Τετραένυδρος χλωριούχος σίδηρος (II) ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (99,99%) (Aldrich, Sigma–Aldrich Ltd., Greece)
- ❖ Χλωριούχος σίδηρος (III) (FeCl_3) (99,99%) (Aldrich, Sigma–Aldrich Ltd., Greece)
- ❖ Δις απεσταγμένο ύδωρ (DDW)

2.1.2. Υλικά

- Ήλιο, καθαρότητας 99,999 %, για την απαέρωση της κινητής φάσης της HPLC
- Μικροσύριγγα όγκου 50 μL με επίπεδα κομμένη βελόνα (VICI, LA, USA)
- Φίλτρα νιτροκυτταρίνης με διάμετρο πόρων 0,45 μm (Millipore Corporation, Billerica, MA 01821, USA)
- Μικροφίλτρα με μεμβράνη κυτταρίνης (0,45 μm) για διήθηση των δειγμάτων πριν την έγχυση στην HPLC (Spartan[®], Schleicher & MicroScience, Dassel, Germany)
- Φίλτρα μικροϊνών υάλου Whatman[®] (GF/F, διαμέτρου 25 mm)

2.2. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ - ΚΙΝΗΤΕΣ ΦΑΣΕΙΣ

2.2.1. Διαλύματα

- Διαλύματα παρακαταθήκης των σακχάρων: μαννοζάνη, λεβογλυκοζάνη, ερυθριτόλη, ξυλιτόλη, αραβιτόλη, μαννόζη, μαννιτόλη, ινοσιτόλη και σακχαρόζη συγκέντρωσης 500 mg/L. Παρασκευάζονται με ζύγιση 10,0 mg στερεής ουσίας και διαλυτοποίηση σε 20 mL μίγματος ACN/H₂O 90/10 (v/v) εντός ογκομετρικής φιάλης χωρητικότητας 20 mL.
- Διάλυμα μυρμηκικού οξέος συγκέντρωσης 1,0 M. Παρασκευάζεται με αραιώση 0,943 mL πυκνού μυρμηκικού οξέος με δις απεσταγμένο ύδωρ (double-distilled water, DDW) σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 25 mL. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται σε πλαστικό περιέκτη με βιδωτό πώμα.
- Διάλυμα μυρμηκικού οξέος συγκέντρωσης 5,0 M. Παρασκευάζεται με αραιώση 4,713 mL πυκνού μυρμηκικού οξέος με DDW σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 25 mL. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται σε πλαστικό περιέκτη με βιδωτό πώμα.

2.2.2. Κινητές φάσεις

➤ Οξύ

- Υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος pH 3,0 περιεκτικότητας 0,1% κατ' όγκο (v/v). Παρασκευάζεται με ανάμιξη 0,250 mL πυκνού μυρμηκικού οξέος με DDW εντός ογκομετρικής φιάλης χωρητικότητας 250 mL.

- Οργανικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος περιεκτικότητας 0,1% κατ' όγκο (v/v). Παρασκευάζεται με ανάμιξη 0,250 mL πυκνού μυρμηκικού οξέος με ACN εντός ογκομετρικής φιάλης χωρητικότητας 250 mL.

➤ **Μυρμηκικό αμμώνιο / μυρμηκικό οξύ**

- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ pH 5,0, συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1576 g HCOONH_4 σε ~200 mL DDW. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (0,140 mL) διαλύματος HCOOH 1,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1576 g HCOONH_4 σε 25-x mL DDW. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος (x=0,140 mL) διαλύματος HCOOH 1,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ pH 5,0, συγκέντρωσης 5 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,0788 g HCOONH_4 σε ~200 mL DDW. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (0,040 mL) διαλύματος HCOOH 1,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ συγκέντρωσης 5 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,0788 g HCOONH_4 σε 25-x mL DDW. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος (x=0,040 mL) διαλύματος HCOOH 1,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ pH 5,0, συγκέντρωσης 2 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,0315 g HCOONH_4 σε ~200 mL DDW. Στη

συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (0,015 mL) διαλύματος HCOOH 1,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.

- Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα HCOONH₄/HCOOH συγκέντρωσης 2 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,0315 g HCOONH₄ σε 25-x mL DDW. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος (x=0,015 mL) διαλύματος HCOOH 1,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα HCOONH₄/HCOOH pH 3,0 συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1576 g HCOONH₄ σε ~200 mL DDW. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (2,600 mL) διαλύματος HCOOH 5,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα HCOONH₄/HCOOH συγκέντρωσης 10 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1576 g HCOONH₄ σε 25-x mL DDW. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος (x=2,600 mL) διαλύματος HCOOH 5,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα HCOONH₄/HCOOH pH 3,0 συγκέντρωσης 5 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,0788 g HCOONH₄ σε ~200 mL DDW. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (1,350 mL) διαλύματος HCOOH 5,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα HCOONH₄/HCOOH συγκέντρωσης 5 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,0788 g HCOONH₄ σε 25-x mL DDW. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος (x=1,350

mL) διαλύματος HCOOH 5,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.

- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ pH 3,0 συγκέντρωσης 2 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,0315 g HCOONH_4 σε ~200 mL DDW. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (500 μL) διαλύματος HCOOH 5,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ συγκέντρωσης 2 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,0315 g HCOONH_4 σε 25-x mL DDW. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος (x=0,500 mL) διαλύματος HCOOH 5,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ pH 5,0 συγκέντρωσης 20 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,3153 g HCOONH_4 σε ~200 mL DDW. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (40 μL) διαλύματος HCOOH 5,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ συγκέντρωσης 20 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,3153 g HCOONH_4 σε 25-x mL DDW. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος (x=0,040 mL) διαλύματος HCOOH 5,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ pH 3,0 συγκέντρωσης 20 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,3153 g HCOONH_4 σε ~200 mL DDW. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (4,400 mL) διαλύματος HCOOH 5,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.

- Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ συγκέντρωσης 20 mM. Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,3153 g HCOONH_4 σε 25-x mL DDW. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος (x=4,400 mL) διαλύματος HCOOH 5,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαράγή.
- ✓ Τα διαλύματα εργασίας των σακχάρων παρασκευάζονται καθημερινά με κατάλληλη αραιώση των διαλυμάτων παρακαταθήκης με κινητή φάση και με κατάλληλη αναλογία $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$, ανάλογα με τις αρχικές συνθήκες έκλουσης.
- ✓ Τα διαλύματα των σακχάρων φυλάσσονται στους +4 °C.
- ✓ Τα υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα, πριν τη μεταφορά τους στις φιάλες HPLC, όπου τοποθετούνται οι κινητές φάσεις, διηθούνται μέσω της συσκευής διήθησης Millipore μέσω φίλτρου νιτροκυτταρίνης 0,45 μm .

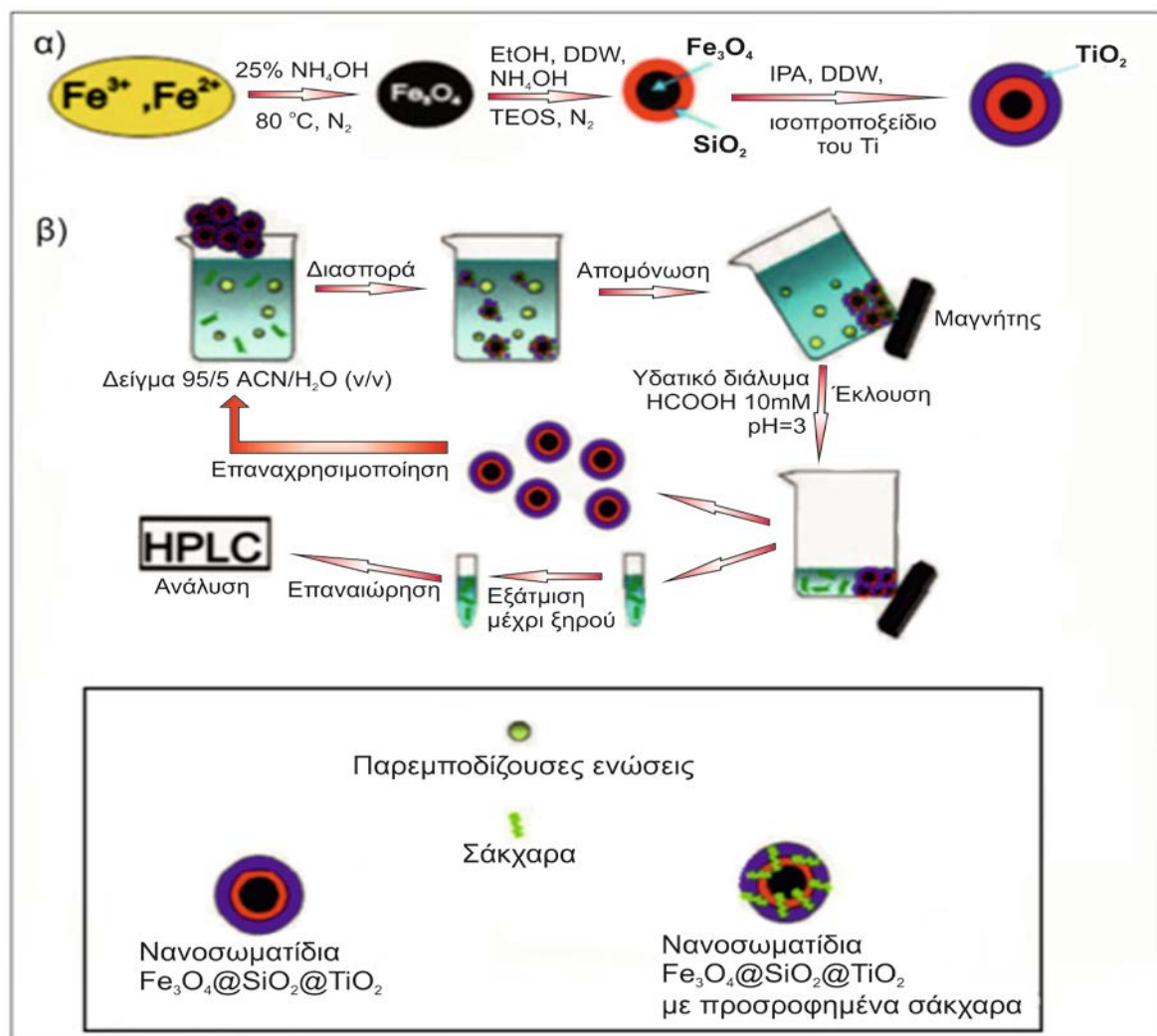
2.3. ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

2.3.1. Σύνθεση μαγνητικού υλικού τιτανίας

Ποσότητα ίση προς 5,0 mL 25% NH_4OH προστίθεται σε αποξυγονωμένο και έντονα αναδευόμενο υδατικό διάλυμα των 250 mL που περιέχει 0,42 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και 0,70 g FeCl_3 , στους 80 °C. Το προϊόν της αντίδρασης που προκύπτει είναι ένα μαύρο ίζημα από νανοσωματίδια του οξειδίου του σιδήρου, το οποίο αφήνεται για ανάδευση για 30 λεπτά, υπό άζωτο, στην ανωτέρω θερμοκρασία. Το ληφθέν μαγνητικό υλικό (~ 0,50 g) εκπλένεται τρεις φορές με DDW και δύο φορές με άνυδρη αιθανόλη.

Η ανωτέρω ποσότητα των νανοσωματιδίων υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία ώστε να επικαλυφθούν με TEOS. Η διαδικασία αυτή συνίσταται στην μεταφορά των νανοσωματιδίων μαγνητίτη σε ένα ποτήρι ζέσεως που περιέχει 25 mL αιθανόλης, 1,0 mL DDW και 0,5 mL αμμωνίας. Ποσότητα 0,5 mL TEOS προστίθεται στάγδην στο διάλυμα υπό άζωτο και ανάδευση. Το αιώρημα αναδεύεται για 24 h υπό ατμόσφαιρα αζώτου και τα σιλανοποιημένα σωματίδια απομονώνονται με μαγνητικό διαχωρισμό και ξεπλένονται με ισοπροπανόλη τρεις φορές. Τα σιλανοποιημένα μαγνητικά σωματίδια αναμιγνύονται με 30 mL ισοπροπανόλης σε ένα ποτήρι ζέσεως και αναδεύονται για 1 ώρα. Στη συνέχεια, στο αιώρημα προστίθενται 10 mL DDW και αναδεύεται για 30 λεπτά. Τέλος, στο μίγμα προ-

στίθενται 3 mL ισοπροποξειδίου του τιτανίου για την επικάλυψη με τιτανία και αναδεύεται για όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα, εκπλένεται με αιθανόλη και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού δίδοντας μία στερεή σκόνη. Τα αντιδραστήρια προστέθηκαν χωρίς χρονική καθυστέρηση (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: Απεικόνιση α) της προετοιμασίας των σωματιδίων $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ και β) της εφαρμογής τους για την εκλεκτική προσρόφηση των σακχάρων.

2.3.2. Χαρακτηρισμός του υλικού με FT-IR

Τα φάσματα FT-IR των σιλανοποιημένων νανοσωματιδίων του οξειδίου του σιδήρου και των σωματιδίων του οξειδίου του σιδήρου / διοξειδίου του πυριτίου / τιτανίας καταγράφηκαν σε ένα Perkin-Elmer Spectrum GX FT-IR φασματοφωτόμετρο με KBr. Οι πα-

στίλιες με KBr παρασκευάστηκαν με ανάμιξη κρυστάλλων KBr με το δείγμα, ύστερα από ξήρανση στους 100 °C και άλεση σε λεπτόκοκκη σκόνη.

2.4. ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε, εφαρμόστηκε σε δείγμα αερολύματος που προήλθε από το κέντρο της πόλης των Ιωαννίνων και συλλέχθηκε τον Ιούλιο του 2011. Το δείγμα συλλέχθηκε σε ένα φίλτρο από μικροΐνες υάλου (GFF, κύκλος 25 mm) με την αναρρόφηση καθορισμένου όγκου αέρα, με ταχύτητα ροής 10 L/min. Πριν από τη δειγματοληψία, το GFF κατεργάσθηκε στους 500 °C επί 4 ώρες και αποθηκεύθηκε σε ψημένο φύλλο αλουμινόχαρτου μέχρι τη δειγματοληψία. Μετά τη συλλογή, η εκχύλιση του GFF διεξήχθη με 3,6 mL διαλύματος 50/50 ACN/H₂O (v/v), στη συσκευή υπερήχων [Sanz, *et al.*, 2007]. Στη συνέχεια, προστέθηκε ACN στο εκχύλισμα έτσι ώστε η τελική σύνθεσή του να γίνει 95/5 ACN/H₂O καθώς και 20 mg σωματιδίων οξειδίου του σιδήρου / διοξειδίου του πυριτίου / τιτανίας ώστε να προσροφηθούν επάνω τους τα σάκχαρα. Τα σάκχαρα επανεκχυλίσθηκαν από το προσροφητικό υλικό με 150 μ L υδατικού διαλύματος μυρμηκικού οξέως (pH ~3). Μετά την εξάτμιση μέχρι ξηρού, το υπόλειμμα επαναιωρήθηκε σε 50 μ L στη σύσταση της κινητής φάσης (ACN/H₂O 90/10 που περιείχε 10 mM μυρμηκικό οξύ) και το εκχύλισμα αναλύθηκε για σάκχαρα. Πριν την έγχυση, το δείγμα διηθήθηκε μέσω φίλτρου μεμβράνης κελουλόζης (cellulose) 0,45 μ m.

2.5. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΤΗΛΕΣ

2.5.1. Στήλη διόλης-πυριτίας

Η χρωματογραφική στήλη διόλης-πυριτίας (HILIC-Diol column) φέρει ως υλικό πλήρωσης σωματίδια πυριτίας (SiO₂), η επιφάνεια της οποίας είναι επικαλυμμένη με διυδροξυπροπυλο- ομάδες (dihydroxy-propyl). Το μήκος της στήλης που χρησιμοποιήθηκε είναι 15 cm, η εσωτερική διάμετρος 4,6 mm και το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης 5 μ m. Συνολικά, η στήλη χαρακτηρίζεται ως ουδέτερη και χημικά σταθερή σε εύρος pH από 2,5 έως 7,0. Λεπτομερή χαρακτηριστικά της στήλης παρατίθενται στον Πίνακα 2.5.1.

2.5.2. Στήλη αμιδο-πυριτίας

Η χρωματογραφική στήλη αμιδο-πυριτίας (HILIC-Amide column) φέρει ως υλικό πλήρωσης σωματίδια πυριτίας (SiO_2), η επιφάνεια της οποίας είναι επικαλυμμένη με καρβαμοϋλο- ομάδες (carbamoyl). Το μήκος της στήλης που χρησιμοποιήθηκε είναι 15 cm, η εσωτερική διάμετρος 4,6 mm και το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης 5 μm . Συνολικά η στήλη χαρακτηρίζεται ως ουδέτερη και χημικά σταθερή σε εύρος pH από 2,5 έως 7,0. Λεπτομερή χαρακτηριστικά της στήλης παρατίθενται στον Πίνακα 2.5.1.

Πίνακας 2.5.1: Λεπτομερή χαρακτηριστικά των χρωματογραφικών στηλών (GL Sciences).

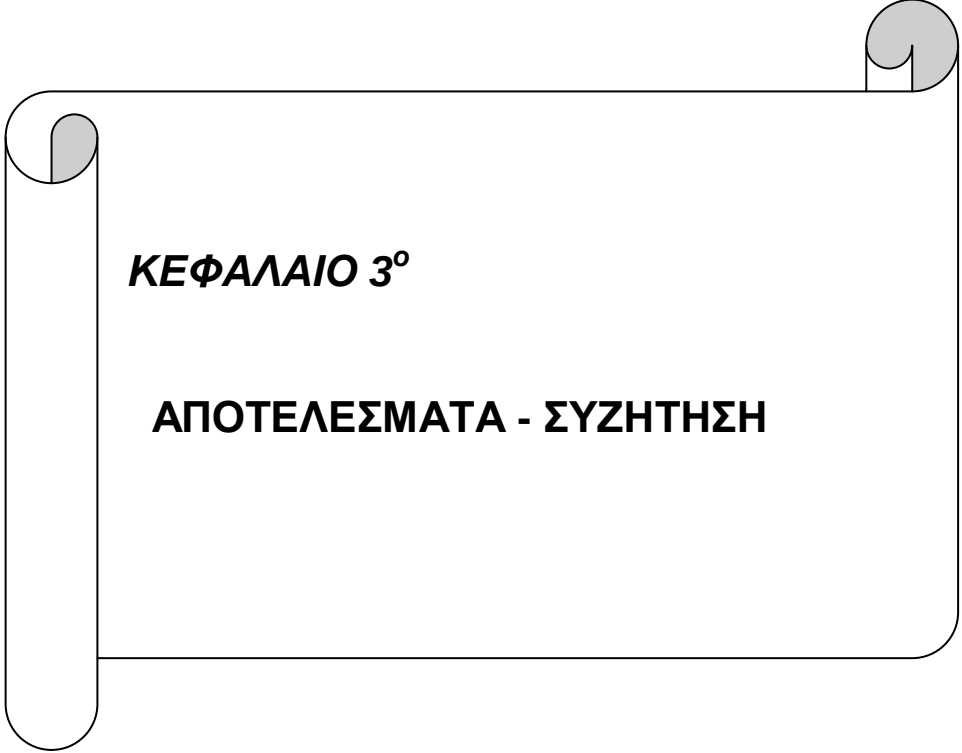
Χαρακτηριστικό	Διόλη-πυριτία	Αμιδο-πυριτία
Μέγεθος σωματιδίων	5 μm	5 μm
Σχήμα σωματιδίων	σφαιρικό	Σφαιρικό
Εμβαδόν επιφάνειας	450 m^2/g	450 m^2/g
Μέγεθος πόρων	100 Å	100 Å
Όγκος πόρων	1,05 mL/g	1,05 mL/g
Καθαρότητα πυριτίας	99,999%	99,999%
Προσδεσμένη φάση	διυδροξυπροπυλο-	καρβαμοϋλο-
Ακροκάλυψη (end-capping)	ναι	Όχι
Ποσοστό άνθρακα	20%	18%
Εύρος pH χρήσης	2,0-7,5	2,0-7,5

2.6. ΟΡΓΑΝΑ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- ο Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Το σύστημα περιλαμβάνει αντλία LC-20ADnr (UFLC) με ενσωματωμένο μίκτη διαλυτών χαμηλής πίεσης, βρόχο δείγματος όγκου 20 μL και χειροκίνητο Rheodyne σύστημα εισαγωγής δείγματος (7725i, Coati, CA, USA) και σύστημα θερμοστάτησης (oven) CTO-10ASnr. Για την απαέρωση των διαλυτών χρησιμοποιείται η συσκευή DGU-2A (Degasser) με παροχή ηλίου από οβίδα. Για την ανίχνευση των σακχάρων χρησιμοποιείται ανιχνευτής σκεδασμού φωτός (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD) ELSD-LT II. Τα δεδομένα συλλέγο-

νται και επεξεργάζονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή στον οποίο είναι εγκατεστημένο το λογισμικό LC Solution, version 1.21. Όλες οι μονάδες της υγρής χρωματογραφίας και το πρόγραμμα συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων είναι της Shimadzu (Tokyo, Japan).

- ο Πεχάμετρο. Αποτελείται από ηλεκτρόδιο υάλου Ag / AgCl (Hamilton, Bonaduz AG, Switzerland), εφοδιασμένο με ηλεκτρονική συσκευή μέτρησης του pH (pH PHM83 AUTOCAL pH METER) (Radiometer, Copenhagen, Denmark).
- ο Συσκευή διπλής απόσταξης ύδατος (Aquatron, A4D, BIBBY Scientific Ltd., UK).
- ο Συσκευή διήθησης όγκου 1L (Millipore Corporation, Billerica, USA).
- ο Υδραντλία δημιουργίας κενού (Büchi B-169, Switzerland).
- ο Αναλυτικός ζυγός (Shimadzu, Tokyo, Japan).
- ο Λουτρό υπερήχων (TRANSSONIC 420, Elma, Germany).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο παρόν μέρος μελετάται η χρωματογραφική συμπεριφορά των σακχάρων: μαννοζάνη, λεβογλυκοζάνη, ερυθριτόλη, ξυλιτόλη, αραβιτόλη, μαννόζη, μαννιτόλη, ινοσιτόλη και σακχαρόζη. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται οι στατικές φάσεις διόλης-πυριτίας και αμιδο-πυριτίας. Οι χρωματογραφικές παράμετροι που εξετάζονται είναι οι ακόλουθες:

- Η ισχύς του διαλύτη έκλουσης μεταβάλλοντας το ποσοστό του ACN στις στατικές φάσεις
- Η συγκέντρωση του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος στο εύρος 2-20 mM
- Το pH της κινητής φάσης
- Η φύση του ρυθμιστικού παράγοντα
- Η θερμοκρασία της στήλης σε εύρος τιμών 20-40 °C
- Η ροή της κινητής φάσης
- Οι παράμετροι του ανιχνευτή: θερμοκρασία εξάτμισης της κινητής φάσης, ευαισθησία (gain), ροή του φέροντος αερίου

Στόχος είναι η διερεύνηση της επίδρασης των ανωτέρω χρωματογραφικών συνθηκών στο χρόνο κατακράτησης των σακχάρων και η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις βέλτιστες συνθήκες αυτών. Στη συνέχεια, η βελτιστοποιημένη μέθοδος εφαρμόζεται σε δείγμα αερολύματος, μετά από τη προσυγκέντρωσή του σε μαγνητικά υλικά τιτανίας.

3.1. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

3.1.1. Επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης στη στατική φάση

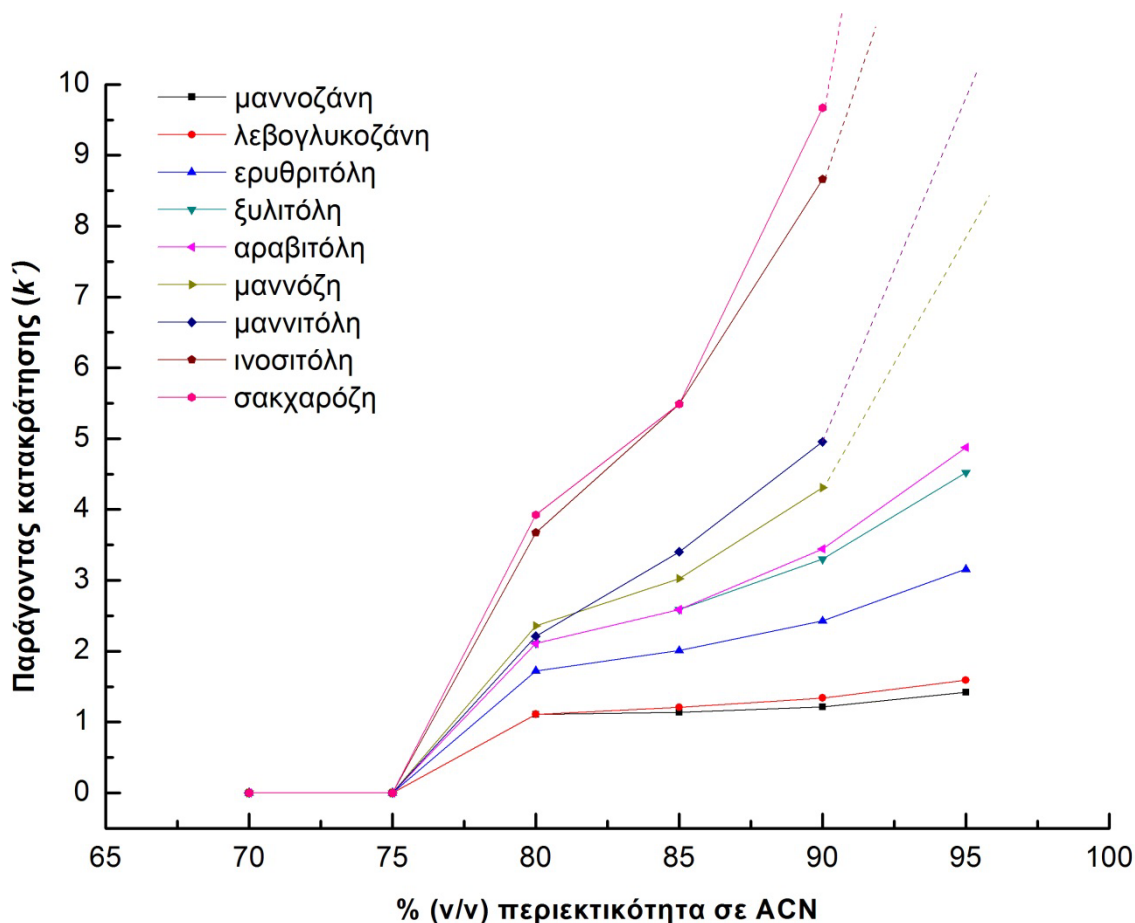
Η χρωματογραφική συμπεριφορά των σακχάρων σε σχέση με την ισχύ του διαλύτη έκλουσης πραγματοποιήθηκε μεταβάλλοντας το ποσοστό του ACN στην κινητή φάση σε στήλη διόλης-πυριτίας και αμιδο-πυριτίας. Ακολούθως, αναλύεται η χρωματογραφική συμπεριφορά των σακχάρων σε συνάρτηση με την ισχύ του διαλύτη έκλουσης στις δύο αυτές στατικές φάσεις και γίνεται επιλογή του καταλληλότερου στατικού μέσου.

3.1.1.1. Επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης σε στήλη διόλης-πυριτίας

Η χρωματογραφική συμπεριφορά των σακχάρων σε σχέση με την ισχύ του διαλύτη έκλουσης πραγματοποιήθηκε μεταβάλλοντας το ποσοστό του ACN στην κινητή φάση από 70 έως 95% (v/v) και χρωματογράφηση ισοκρατικά με ταχύτητα ροής 0,8 mL/min. Η κινητή φάση περιείχε διάλυμα μυρμηκικού οξέος συγκέντρωσης 10 mM και pH 3,0 τόσο στην υδατική όσο και στην οργανική φάση.

Στο Σχήμα 3.1.1.1 απεικονίζεται γραφικά η επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης στις τιμές του k' των σακχάρων, ενώ στον Πίνακα 3.1.1.1 παρατίθενται οι αντίστοιχες τιμές του παράγοντα συμμετρίας (παράγοντα εμφάνισης “ουράς”, T_r) της κάθε κορυφής. Σε αναλογία διαλυτών ACN/H₂O 70/30 και 75/25 (v/v) οι κορυφές εμφανίζουν πολύ μικρή κατακράτηση ($k' < 1$) από τη στήλη. Σε ποσοστό ACN μεγαλύτερο από 80% (v/v) γίνεται εμφανής η αύξηση της κατακράτησης των ενώσεων ($1,11 < k'$), η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη του ποσοστού του ύδατος στην κινητή φάση και ανάλογη της πολικότητας των ενώσεων [Alpert, 1990, Guo, *et al.*, 2005, Guo, *et al.*, 2003, Li, *et al.*, 2004]. Από το Σχήμα 3.1.1.1 παρατηρείται ότι η σημαντική διαφοροποίηση στην κατακράτηση των ενώσεων λαμβάνει χώρα στο εύρος περιεκτικότητας 80-95% σε ACN. Συγκεκριμένα, η τιμή του k' για τη μαννοζάνη, τη λεβογλυκοζάνη, την ερυθριτόλη, τη ξυλιτόλη και την αραβιτόλη αυξάνεται κατά 0,31, 0,48, 1,44, 2,41 και 2,77 μονάδες αντίστοιχα. Η αύξηση της κατακράτησης από τη στήλη είναι κατά πολύ μεγαλύτερη στη μαννόζη, στη μαννιτόλη, στην ινοσιτόλη και στη σακχαρόζη με τις τιμές του k' να αυξάνονται πάνω από 7 μονάδες. Αυτό οφείλεται στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου τόσο με μόρια ύδατος όσο και με τη στατική φάση και στον αυξημένο αριθμό των υδροξυλομάδων που παρουσιάζουν οι εξόζες, μαννόζη, μαννιτόλη και ινοσιτόλη, καθώς και ο δισακχαρίτης, σακχαρόζη. Αποτέλεσμα αυτού είναι να παρουσιάζουν πιο υδρόφιλο χαρακτήρα και να κατακρατούνται ισχυ-

ρότερα από την ουδέτερη στήλη της διόλης, έναντι των άνυδρο-σακχάρων, μαννοζάνη και λεβογλυκοζάνη, της τετρώξης ερυθριτόλης, καθώς και των πεντοζών, ξυλιτόλη και αραβιτόλη.



Σχήμα 3.1.1.1: Επίδραση του ποσοστού του ACN της κινητής φάσης στην κατακράτηση των σακχάρων σε στήλη διόλης-πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες:

Διαλύτης Α: [H₂O + HCOOH 10 mM, pH 3.0]

Διαλύτης Β: [90% ACN / 10% H₂O + HCOOH 10 mM]

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C, Ταχύτητα ροής κινητής φάσης: 0,8 mL/min

Ανιχνευτής: ELSD, σε θερμοκρασία 40 °C

Το ποσοστό του οργανικού διαλύτη (ACN), αποτελεί ίσως την παράμετρο με την μεγαλύτερη επίδραση στο χρόνο κατακράτησης [Guo, *et al.*, 2005]. Σε υψηλά ποσοστά ύδατος στην κινητή φάση η διαφορά πολικότητας μεταξύ του διαλύτη έκλουσης και της στιβάδας ύδατος στην επιφάνεια της στήλης ελαττώνεται σημαντικά με αποτέλεσμα μια πολική ένωση να εμφανίζει μικρό χρόνο κατακράτησης. Καθώς το ποσοστό του οργανικού διαλύτη αυξάνεται (>80%) η μεγάλη διαφορά στην πολικότητα μεταξύ της ενυδατωμένης

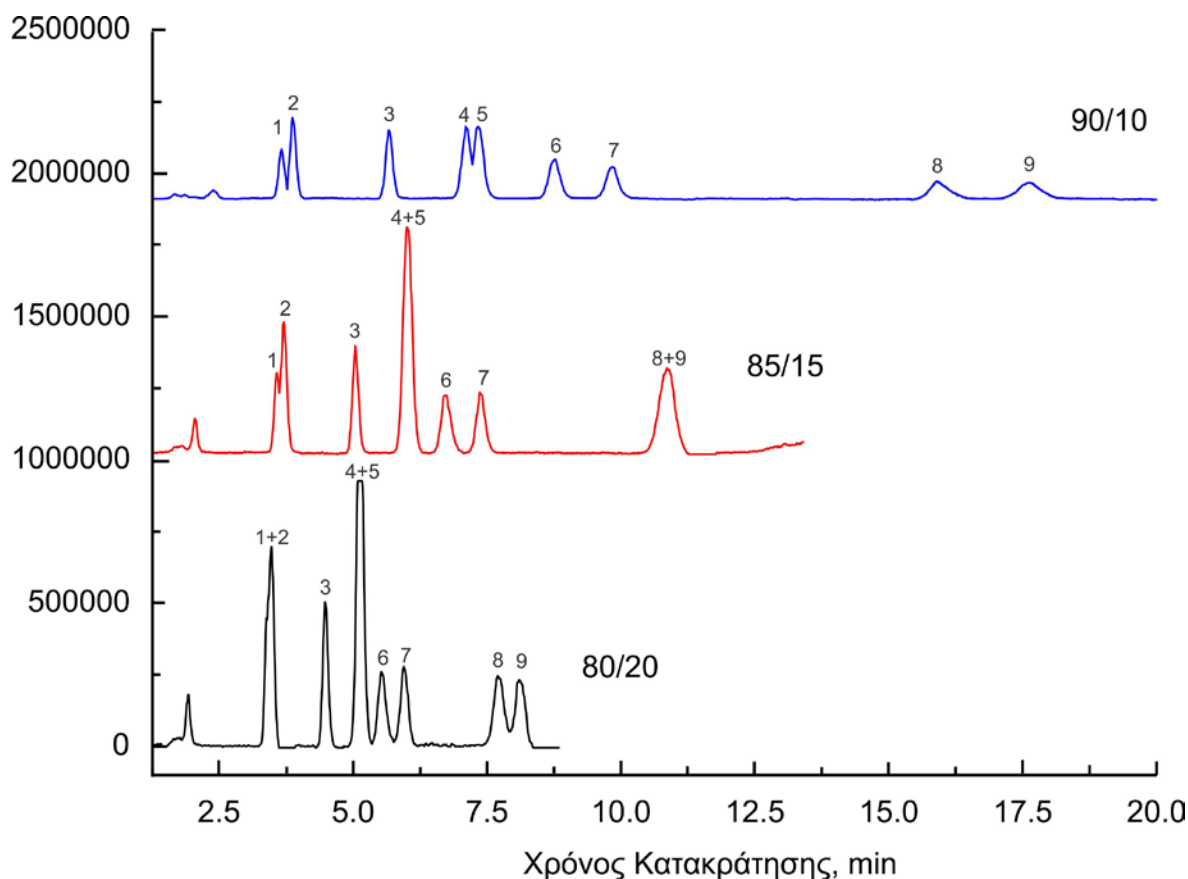
επιφάνειας της στήλης και του διαλύτη έκλουσης επιτρέπει την κατανομή της ένωσης στην υδατική στιβάδα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και επομένως την αύξηση του χρόνου κατακράτησης [McCalley, *et al.*, 2008].

Πίνακας 3.1.1.1: Επίδραση της εκλουστικής ισχύος στην συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών.

Ένωση	Παράγοντας T_f			
	ACN/H ₂ O 80/20	ACN/H ₂ O 85/15	ACN/H ₂ O 90/10	ACN/H ₂ O 95/5
Μαννοζάνη	1,2	1,1	1,1	1,2
Λεβογλυκοζάνη	1,2	1,1	1,1	1,2
Ερυθριτόλη	1,2	1,1	1,1	1,2
Ξυλιτόλη	1,2	1,1	1,1	1,1
Αραβιτόλη	1,2	1,1	1,1	1,1
Μαννόζη	1,2	1,1	1,1	1,0
Μαννιτόλη	1,2	1,1	1,1	1,8
Ινοσιτόλη	1,1	1,0	1,1	>1,8
Σακχαρόζη	1,1	1,0	1,1	>1,8

Η ασυμμετρία μιας κορυφής και πιο συγκεκριμένα η εμφάνιση “ουράς” (tailing, T_f) ή “μετώπου” (fronting) αποτελεί μια σημαντική παράμετρο καθότι επηρεάζει αρνητικά τόσο την επαναληψιμότητα του χρόνου έκλουσης μιας κορυφής όσο και το διαχωρισμό ενός ζεύγους ενώσεων. Οι παράγοντες T_f για το σύνολο των κορυφών σε αναλογία διαλυτών ACN/H₂O 80/20, 85/15 και 90/10 (v/v) κυμαίνονται από 1,0 έως 1,2 παρουσιάζοντας πολύ καλή συμμετρία. Σε ποσοστό ACN 95% (v/v), οι παράγοντες T_f για τις κορυφές της μαννοζάνης, της λεβογλυκοζάνης, της ερυθριτόλης, της ξυλιτόλης, της αραβιτόλης και της μαννόζης εξακολουθούν να κυμαίνονται από 1,0 έως 1,2, ενώ οι κορυφές της μαννιτόλης, της ινοσιτόλης και της σακχαρόζης εμφανίζουν “ουρά” με τους παράγοντες T_f να έχουν τιμές από 1,8 και άνω. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη κατακράτηση που παρουσιάζουν οι πιο πολικές ενώσεις της μαννιτόλης, της ινοσιτόλης και της σακχαρόζης όταν το ποσοστό του οργανικού διαλύτη (ACN) αυξάνεται [Alpert, 1990, Gika, *et al.*, 2012].

Στο Σχήμα 3.1.1.2 απεικονίζονται συγκριτικά χρωματογραφήματα των σακχάρων σε αναλογίες διαλυτών ACN/H₂O 80/20, 85/15 και 90/10 (v/v) και σε συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης, ενώ οι αντίστοιχες τιμές της διαχωριστικής ικανότητας (R_s) της στήλης στο μίγμα των ενώσεων παρατίθενται στον Πίνακα 3.1.1.2.



Σχήμα 3.1.1.2: Επίδραση του ποσοστού του ACN στον ισοκρατικό διαχωρισμό των σακχάρων σε στήλη διόλης-πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.1.1.1.

Χρωματογραφικές κορυφές: 1) μαννοζάνη, 2) λεβογλυκοζάνη, 3) ερυθριτόλη, 4) ξυλιτόλη, 5) α-ραβιτόλη, 6) μαννόζη, 7) μαννιτόλη, 8) ινοσιτόλη, 9) σακχαρόζη

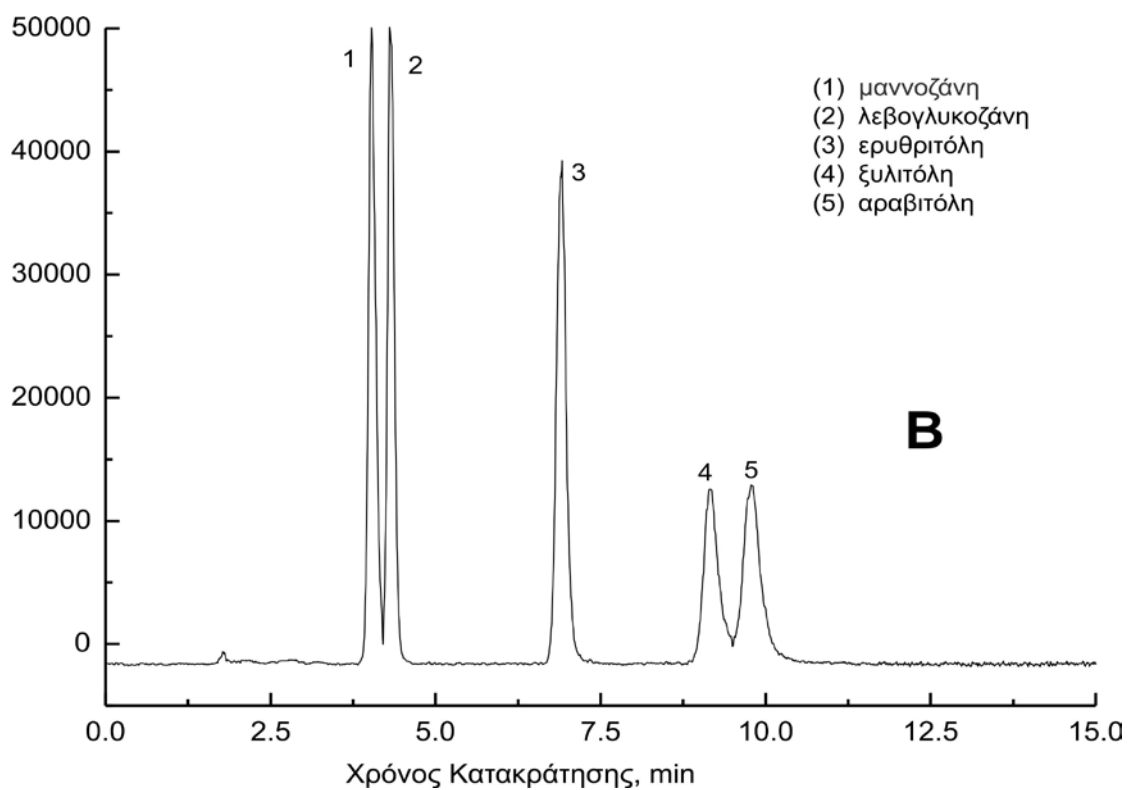
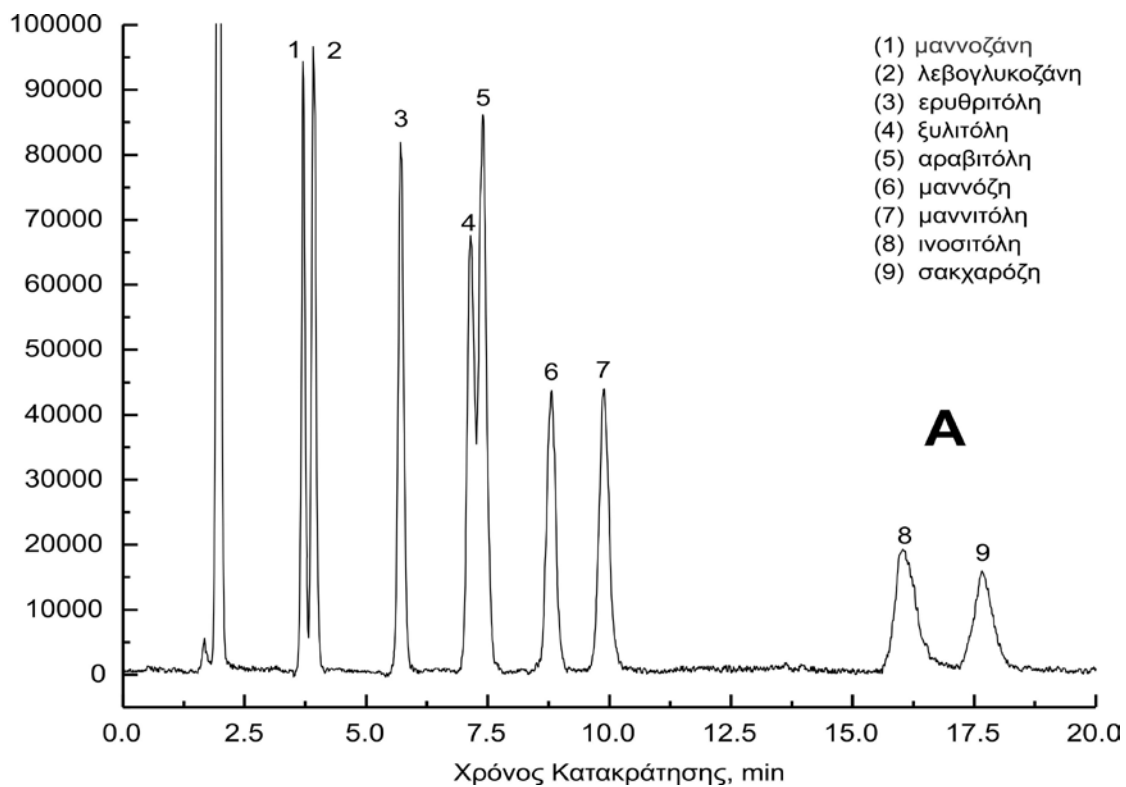
Σε ποσοστό ACN 70% (v/v) το σύνολο των σακχάρων εμφανίζουν σχεδόν τον ίδιο χρόνο κατακράτησης με αποτέλεσμα ο διαχωρισμός τους να είναι ανέφικτος, ενώ σε ποσοστό ACN άνω του 75% (v/v) παρατηρείται μια μη γραμμική αύξηση των χρόνων κατακράτησης των σακχάρων. Σε ποσοστό ACN 80% (v/v) επέρχεται αύξηση του χρόνου κατακράτησης των ενώσεων, οι οποίες αρχίζουν πλέον να διαχωρίζονται. Εντούτοις, οι ενώσεις μαννοζάνη/λεβογλυκοζάνη και ξυλιτόλη/αραβιτόλη εξακολουθούν να συνεκλούνται ενώ το ζεύγος ενώσεων ινοσιτόλη/σακχαρόζη εμφανίζει ατελή διαχωρισμό έχοντας R_s μικρότερο από την τιμή 1,50 (Πίνακας 3.1.1.2). Αυξάνοντας το ACN σε ποσοστό 90% (v/v) προκύπτει περαιτέρω αύξηση των χρόνων κατακράτησης με αποτέλεσμα τον πλήρη διαχωρισμό των συστατικών με τις τιμές διαχωριστικής ικανότητας (R_s) να κυμαίνονται από 0,89 έως 10,90.

Πίνακας 3.1.1.2: Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα σακχάρων συναρτήσει του ποσοστού του ACN (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.1.1.1).

Ζεύγος ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα, R_s			
	ACN/H ₂ O 80/20	ACN/H ₂ O 85/15	ACN/H ₂ O 90/10	ACN/H ₂ O 95/5
μαννοζάνη / λεβογλυκοζάνη	συνέκλουση	0,62	1,28	1,51
λεβογλυκοζάνη/ ερυθριτόλη	4,25	5,70	7,21	10,37
ερυθριτόλη / ξυλιτόλη	2,78	3,51	4,22	5,98
ξυλιτόλη / αραβιτόλη	συνέκλουση	συνέκλουση	0,89	1,21
αραβιτόλη / μαννόζη	1,52	2,19	3,58	-
μαννόζη / μαννιτόλη	1,49	1,84	2,58	-
μαννιτόλη / ινοσιτόλη	5,40	8,00	10,90	-
ινοσιτόλη / σακχαρόζη	1,17	συνέκλουση	2,27	-

Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): $R_s \approx 1,50$

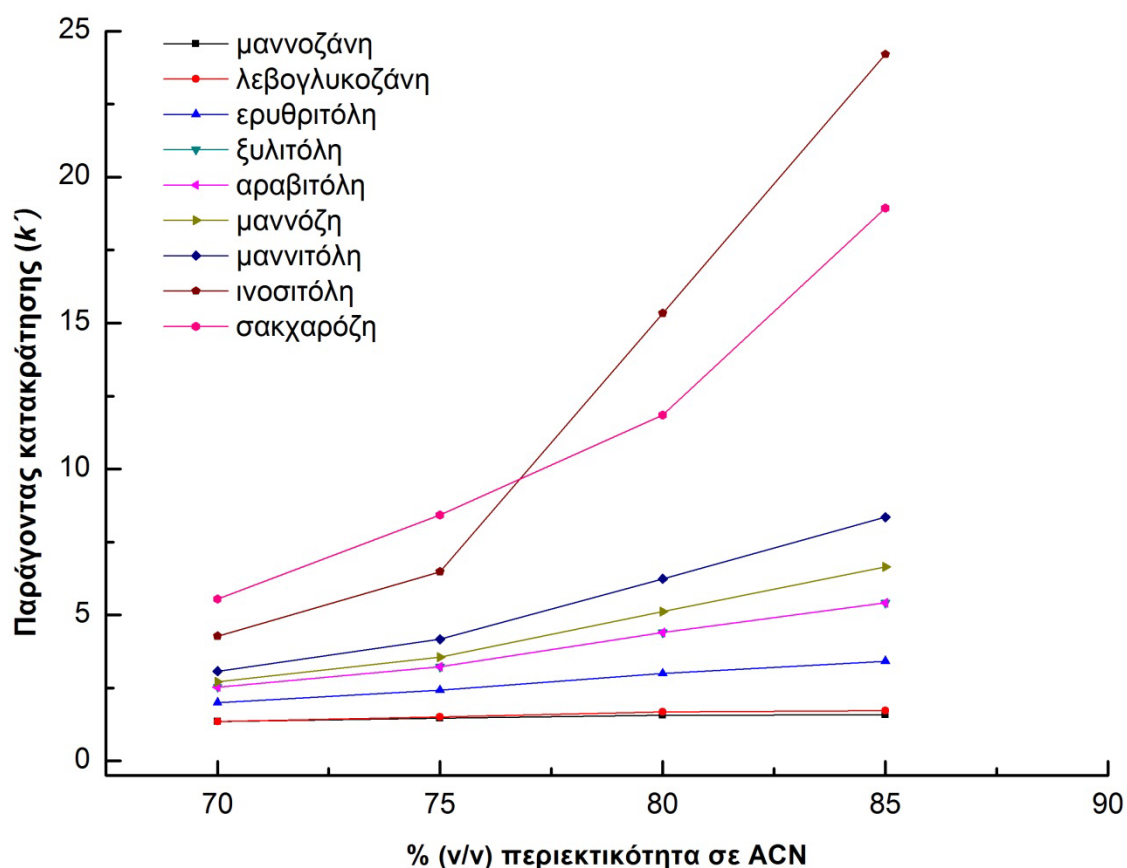
Ωστόσο, σε ποσοστό ACN 90% (v/v), τα ισομερή σάκχαρα μαννοζάνη και λεβογλυκοζάνη εκκλύονται σε σχετικά σύντομο χρόνο και δεν κατακρατούνται ισχυρά στη στήλη. Για το λόγο αυτό, ο διαχωρισμός τους δεν είναι ολοκληρωτικός (έως τη γραμμή βάσης). Αποτελεσματικότερος διαχωρισμός αυτών των δύο ενώσεων λαμβάνει χώρα αυξάνοντας το ποσοστό του ACN σε ποσοστό 95% (v/v), ενώ το ίδιο ισχύει και για τα άλλα δύο ισομερή σάκχαρα, την ξυλιτόλη και την αραβιτόλη. Υπό αυτές όμως τις συνθήκες, τα υπόλοιπα σάκχαρα εμφανίζουν αρκετά ευρείες κορυφές και πολύ μεγάλους χρόνους κατακράτησης (Σχήμα 3.1.1.3).



Σχήμα 3.1.1.3: Γραφική απεικόνιση του ισοκρατικού διαχωρισμού των σακχάρων σε στήλη διόλης-πυριτίας. (A) ACN/H₂O 90/10 (v/v) σε 10 mM μυρμηκικού οξέος και (B) ACN/H₂O 95/5 (v/v) σε 10 mM μυρμηκικού οξέος. Χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.1.1.1.

3.1.1.2. Επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης σε στήλη αμιδο-πυριτίας

Η χρωματογραφική συμπεριφορά των σακχάρων, στη στήλη αμιδο-πυριτίας, ως συνάρτηση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης πραγματοποιήθηκε μεταβάλλοντας το ποσοστό του ACN στην κινητή φάση από 70 έως 85% (v/v) και χρωματογράφηση ισοκρατικά με ταχύτητα ροής 0,8 mL/min. Η κινητή φάση περιείχε διάλυμα μυρμηκικού οξέος συγκέντρωσης 10 mM και pH 3,0 τόσο στην υδατική όσο και στην οργανική φάση. Στο Σχήμα 3.1.1.4 απεικονίζεται γραφικά η επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης στους παράγοντες κατακράτησης, k' , των σακχάρων.



Σχήμα 3.1.1.4: Επίδραση του ποσοστού του ACN της κινητής φάσης στην κατακράτηση των σακχάρων σε στήλη αμιδο-πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες:

Διαλύτης A: [H₂O + HCOOH 10 mM, pH 3.0]

Διαλύτης B: [90% ACN / 10% H₂O + HCOOH 10 mM]

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C, Ταχύτητα ροής κινητής φάσης: 0,8 mL/min

Ανιχνευτής: ELSD, σε θερμοκρασία 40 °C

Η χρωματογραφική συμπεριφορά των ουδέτερων σακχάρων στη στήλη αμιδο-πυριτίας επιδεικνύει παρόμοια εικόνα σε σύγκριση με τη στήλη διόλης-πυριτίας. Σε αναλογία διαλυτών ACN/H₂O 70/30 (v/v) οι κορυφές εμφανίζουν σχετικά μικρή κατακράτηση ($1,35 < k' < 5,55$) από τη στήλη. Σε ποσοστό ACN μεγαλύτερο από 75% (v/v) παρατηρείται αύξηση της κατακράτησης των ενώσεων ($1,46 < k'$), η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη του ποσοστού του ύδατος στην κινητή φάση και ανάλογη της πολικότητας των ενώσεων [Alpert, 1990, Guo, *et al.*, 2005, Guo, *et al.*, 2003, Li, *et al.*, 2004]. Από το Σχήμα 3.1.1.4 παρατηρείται ότι η σημαντική διαφοροποίηση στην κατακράτηση των ενώσεων λαμβάνει χώρα σε ποσοστό περιεκτικότητας 85% σε ACN. Συγκεκριμένα, η τιμή του k' για τη μαννοζάνη, τη λεβογλυκοζάνη, την ερυθριτόλη, τη ξυλιτόλη και την αραβιτόλη αυξάνεται κατά 0,23, 0,38, 1,42, 2,88 και 2,88 μονάδες αντίστοιχα, ενώ για τη μαννόζη και τη μαννιτόλη κατά 3,94 και 5,35, αντίστοιχα. Εδώ παρατηρείται ότι τα ισομερή σάκχαρα ξυλιτόλη και αραβιτόλη εξακολουθούν να συνεκλούνται, ενώ η αύξηση της κατακράτησης από τη στήλη είναι μεγαλύτερη στην ινοσιτόλη και στη σακχαρόζη με τις τιμές του k' να αυξάνονται κατά 19,95 και 13,45 μονάδες. Αυτό οφείλεται στον αυξημένο αριθμό των υδροξυλομάδων που παρουσιάζουν η εξόζη, ινοσιτόλη, καθώς και ο δισακχαρίτης, σακχαρόζη, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν πιο υδρόφιλο χαρακτήρα και να κατακρατούνται ισχυρότερα από την ουδέτερη στήλη της αμιδο-πυριτίας, έναντι των άνυδρο-σακχάρων, μαννοζάνη και λεβογλυκοζάνη, και των υπόλοιπων σακχάρων. Παρατηρείται, λοιπόν, ότι η εκλεκτικότητα της στήλης αμιδο-πυριτίας είναι ίδια με αυτή της στήλης διόλης-πυριτίας.

Σε χρωματογραφικές τεχνικές όπου ο μηχανισμός κατακράτησης είναι τόσο η κατανομή [Karatapanis, *et al.*, 2011c] όσο και η επιφανειακή προσρόφηση [Dinh, *et al.*, 2011, Karatapanis, *et al.*, 2010] (HILIC), στις ουδέτερες στατικές φάσεις όπως είναι η διόλη-πυριτία και η αμιδο-πυριτία, οι αλληλεπιδράσεις που υφίστανται στην επιφάνεια της ενυδατωμένης στατικής φάσης μεταξύ των υδροξυ- και αμινο- ομάδων του στατικού μέσου και των πολικών ομάδων των αναλυτών είναι δεσμοί υδρογόνου και δυνάμεις διπόλου-διπόλου [Alpert, 2007]. Ωστόσο, παρατηρείται ισχυρότερη κατακράτηση των σακχάρων στην αμιδο- στήλη, γεγονός που αποδίδεται σε ισχυρότερες δυνάμεις δότη-δέκτη του δεσμού υδρογόνου (μεγαλύτεροι συντελεστές α_H και β_H) που παρουσιάζουν οι καρβαμούλο- (αμιδο-) ομάδες σε σύγκριση με τις διυδροξυπρόπυλο- (διόλο-) ομάδες [Abraham, *et al.*, 2001]. Η συμπεριφορά των ενώσεων στις δύο αυτές στατικές φάσεις επιβεβαιώνει την ύπαρξη ενός μικτού μηχανισμού κατακράτησης στην HILIC.

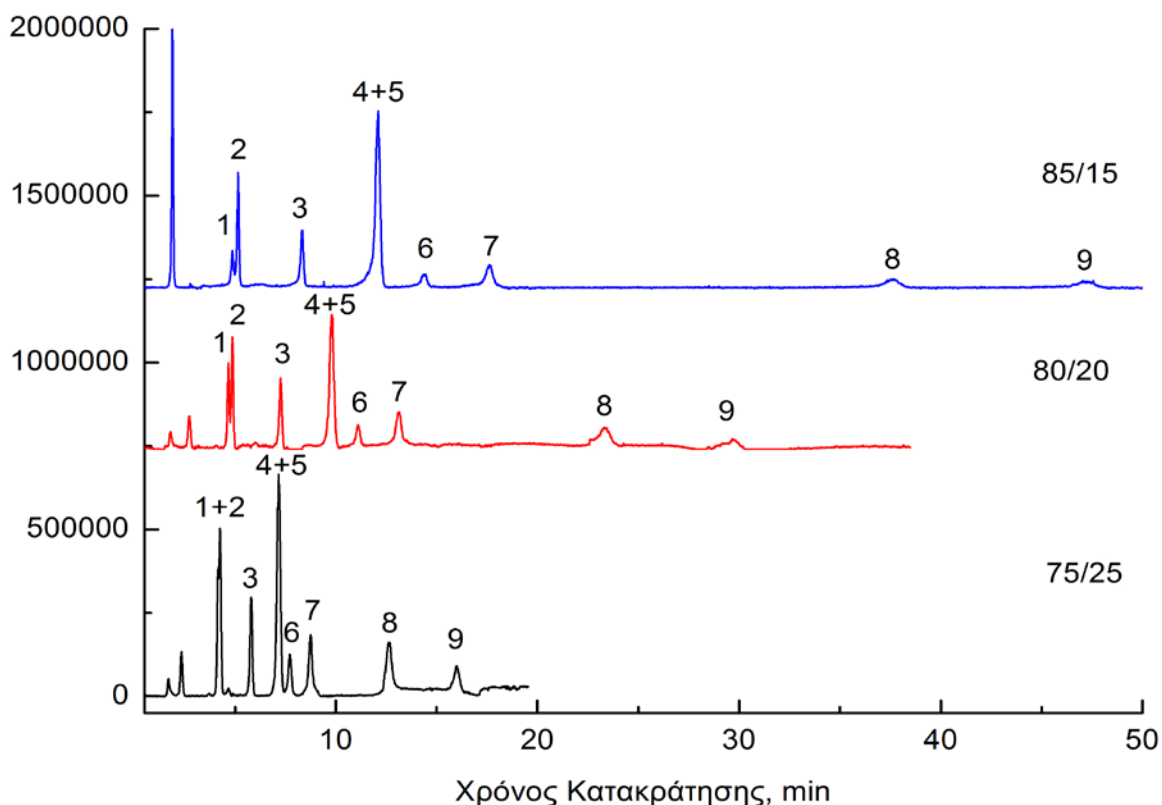
Η συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών σε ποσοστό ACN από 70-85% (v/v) στο στατικό μέσο της αμιδο-πυριτίας δεν είναι ικανοποιητική με το συντελεστή T_f να κυμαίνεται από 0,7-1,0, ($T_f < 1,0$) (Πίνακας 3.1.1.3). Η συμπεριφορά αυτή των ενώσεων οφείλε-

ται πιθανόν σε υπερφόρτωση της στήλης ή σε τυχόν αλληλεπίδραση των σακχάρων με τη στατική φάση κατά τη διάρκεια της ανάλυσης.

Πίνακας 3.1.1.3: Επίδραση της εκλουστικής ισχύος στην συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών.

Ένωση	Παράγοντας T_f			
	ACN/H ₂ O 70/30	ACN/H ₂ O 75/25	ACN/H ₂ O 80/20	ACN/H ₂ O 85/15
Μαννοζάνη	0,9	0,9	0,9	0,8
Λεβογλυκοζάνη	0,9	0,9	0,9	0,8
Ερυθριτόλη	1,0	0,9	0,9	0,8
Ξυλιτόλη	0,9	1,0	0,9	0,7
Αραβιτόλη	0,9	1,0	0,9	0,7
Μαννόζη	1,0	1,0	0,9	0,7
Μαννιτόλη	1,0	1,0	0,9	0,8
Ινοσιτόλη	0,9	1,0	0,9	0,9
Σακχαρόζη	0,9	0,9	0,8	0,7

Στο Σχήμα 3.1.1.5 απεικονίζονται συγκριτικά χρωματογραφήματα των σακχάρων σε αναλογίες ACN/H₂O 75/25, 80/20 και 85/15 (v/v) και σε συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης, ενώ οι αντίστοιχες τιμές της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα των ενώσεων παρατίθενται στον Πίνακα 3.1.1.4.



Σχήμα 3.1.1.5: Επίδραση του ποσοστού του ACN στον ισοκρατικό διαχωρισμό των σακχάρων σε στήλη αμιδο-πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο σχήμα 3.1.1.1.

Χρωματογραφικές κορυφές: 1) μαννοζάνη, 2) λεβογλυκοζάνη, 3) ερυθριτόλη, 4) ξυλιτόλη, 5) α-ραβιτόλη, 6) μαννόζη, 7) μαννιτόλη, 8) ινοσιτόλη, 9) σακχαρόζη

Σε ποσοστό ACN 70% και 75% (v/v) ο διαχωρισμός των ισομερών σακχάρων είναι ατελής ($R_s=0$) και παρατηρείται συνέκλουση των ισομερών ζευγών μαννοζάνη/λεβογλυκοζάνη και ξυλιτόλη/αραβιτόλη. Σε ποσοστό ACN 80% (v/v) επέρχεται αύξηση των χρόνων κατακράτησης των ενώσεων και αυξάνοντας το ACN σε ποσοστό 85% (v/v) επέρχεται διαχωρισμός, με τις τιμές διαχωριστικής ικανότητας (R_s) να κυμαίνονται από 1,21 έως 26,15, με εξαίρεση το ζεύγος ισομερών ενώσεων ξυλιτόλη/αραβιτόλη το οποίο εξακολουθεί να συνεκλούεται, ενώ το ζεύγος μαννοζάνη/λεβογλυκοζάνη εμφανίζει ατελή διαχωρισμό έχοντας R_s μικρότερο από την τιμή 1,50 (Πίνακας 3.1.1.4). Αξιοσημείωτη είναι η αυξημένη κατακράτηση που εμφανίζουν τα σάκχαρα σε αναλογία διαλυτών 85/15 (v/v), έτσι περαιτέρω αύξηση του οργανικού διαλύτη θα είχε ως αποτέλεσμα εξαιρετικά μεγάλους χρόνους κατακράτησης. Καθώς αυξάνει το ποσοστό του ACN στην κινητή φάση (>70% v/v), αυξάνεται και η υδρόφιλη κατανομή των ενώσεων και οι δεσμοί υδρογόνου, με συνέπεια την αύξηση της κατακράτησης, μια τυπική χρωματογραφική συμπεριφορά στην τεχνική της HILIC.

Με βάση όλων των ανωτέρω, συμπεραίνεται ότι η στήλη της διόλης-πυριτίας είναι ιδανικότερη για τη μελέτη και το διαχωρισμό των σακχάρων με κινητή φάση που αποτελείται από 90% (v/v) ACN και συγκέντρωση μυρμηκικού οξέος 10 mM (βλέπε στη συνέχεια).

Πίνακας 3.1.1.4: Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα σακχάρων συναρτήσει του ποσοστού του ACN (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.1.1.1).

Ζεύγος ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα, R_s			
	ACN/H ₂ O 70/30	ACN/H ₂ O 75/25	ACN/H ₂ O 80/20	ACN/H ₂ O 85/15
μαννοζάνη / λεβογλυκοζάνη	συνέκλουση	συνέκλουση	1,00	1,21
λεβογλυκοζάνη/ ερυθριτόλη	5,10	6,30	10,35	12,87
ερυθριτόλη / ξυλιτόλη	3,83	4,99	7,70	10,51
ξυλιτόλη / αραβιτόλη	συνέκλουση	συνέκλουση	συνέκλουση	συνέκλουση
αραβιτόλη / μαννόζη	1,16	1,73	3,42	5,08
μαννόζη / μαννιτόλη	2,31	3,21	4,54	5,69
μαννιτόλη / ινοσιτόλη	6,52	9,03	15,57	26,15
ινοσιτόλη / σακχαρόζη	5,80	6,32	8,74	11,52

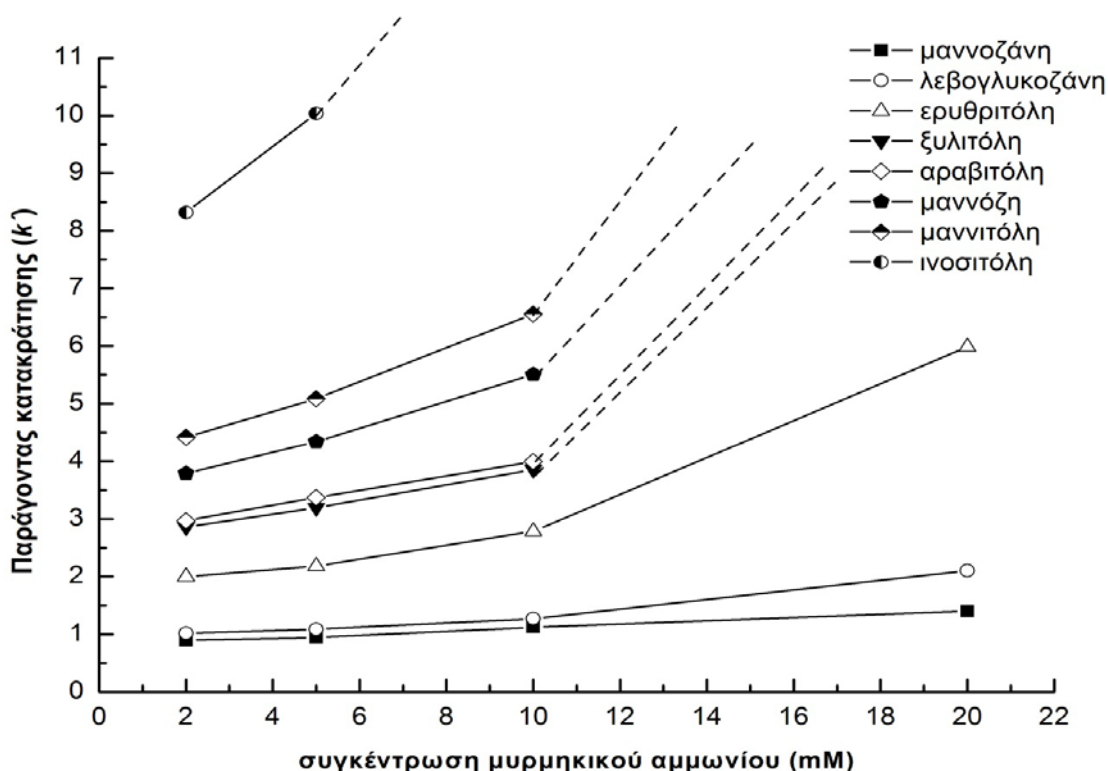
Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): $R_s \approx 1,50$

3.1.2. Μυρμηκικό αμμώνιο vs. μυρμηκικό οξύ στην κινητή φάση

Για τη μελέτη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των σακχάρων σε σχέση με το pH της κινητής φάσης, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου/μυρμηκικού οξέως για pH 3,0 και pH 5,0, σε κινητή φάση που αποτελείται από 90% (v/v) ACN. Οι συγκεντρώσεις των αλάτων σε όλες τις περιπτώσεις ήταν 10 mM. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε σχεδόν καμία διαφορά στους χρόνους κατακράτησης μεταξύ των δύο τιμών pH των μιγμάτων σε pH 3,0 και pH 5,0, γεγονός που αποδίδεται πιθανότατα στον ουδέτερο χαρακτήρα των σακχάρων που μελετήθηκαν, καθώς συμπεριφέρονται ως ασθενή οξέα με τις τιμές του pK_a να κυμαίνονται περίπου στις 12-14 μονάδες.

Εν συνεχεία, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου/μυρμηκικού οξέως στην κατακράτηση των ενώσεων σε pH 3,0, μιας και η κατακράτηση δεν επηρεάζεται από την τιμή του pH. Το εύρος συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου στην κινητή φάση ήταν 2-20 mM. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου δεν ήταν εφικτή λόγω του περιορισμού της διαλυτότητας του άλατος στην οργανική φάση.

Στο Σχήμα 3.1.2 απεικονίζεται η επίδραση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμ-
μωνίου/μυρμηκικού οξέως στην κατακράτηση των σακχάρων σε 90% (v/v) περιεκτικότητα
σε ACN στην κινητή φάση και σε pH 3,0. Από το παρακάτω σχήμα γίνεται αντιληπτό ότι η
αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος από 2 σε 5 mM επηρεάζει τον παράγοντα κατα-
κράτησης της ινοσιτόλης περισσότερο από ό,τι το σύνολο των υπόλοιπων σακχάρων που
μελετήθηκαν. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ινοσιτόλη είναι ο μονοσακχαρίτης που κατακρατεί-
ται ισχυρότερα στη στήλη μιας και έχει περισσότερες υδροξυλομάδες στο μόριό του από
τους υπόλοιπους μονοσακχαρίτες. Από την άλλη μεριά ο παράγοντας κατακράτησης των
άνυδρο-σακχάρων μαννοζάνη και λεβογλυκοζάνη παραμένει σχεδόν αμετάβλητος στο
εύρος συγκέντρωσης 2-10 mM του μυρμηκικού αμμωνίου ενώ μια μικρή αύξηση του πα-
ράγοντα κατακράτησης είναι ορατή με την αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος από 10-
20 mM. Σε συγκέντρωση μυρμηκικού αμμωνίου 10 mM, εκτός των άνυδρο-σακχάρων, τα
υπόλοιπα σάκχαρα παρουσιάζουν μια σαφή αύξηση του παράγοντα κατακράτησής τους
ενώ με την αύξηση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου από τα 10 mM στα 20
mM, η κατακράτηση των ένυδρο-σακχάρων αυξάνεται σημαντικά ($k' > 14$) (Σχήμα 3.1.2).



Σχήμα 3.1.2: Γραφική απεικόνιση της επίδρασης της συγκέντρωσης του HCOONH_4 στον παράγο-
ντα κατακράτησης των σακχάρων σε στήλη διόλης-πυριτίας και σε αναλογία διαλύτη έκλουσης
 $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ 90/10 (v/v). Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.1.1.1. Πληροφορίες
για την σακχαρόζη δεν αναφέρονται επειδή εκλύεται σε μεγάλους χρόνους.

Σύμφωνα με το μηχανισμό της HILIC, σε υψηλά ποσοστά ACN στην κινητή φάση τα ιόντα του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος "προτιμούν" να κατανέμονται (στο μεγαλύτερο ποσοστό τους) στη στιβάδα ύδατος που βρίσκεται στην επιφάνεια της στήλης. Με αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος στην κινητή φάση, όλο και περισσότερα επιδιαλυτωμένα ιόντα κατανέμονται στην υδατική στιβάδα με αποτέλεσμα την αύξηση της υδροφιλικότητάς της και επομένως την αύξηση του χρόνου κατακράτησης των ενώσεων μέσω του μηχανισμού κατανομής [Guo, *et al.*, 2005].

Η επίδραση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου στη συμμετρία των κορυφών φαίνεται στον Πίνακα 3.1.2.1. Από τον Πίνακα 3.1.2.1, είναι φανερό ότι οι χρωματογραφικές κορυφές των σακχάρων παρουσιάζουν ικανοποιητική συμμετρία στο εξεταζόμενο εύρος συγκέντρωσης 2-20 mM του μυρμηκικού αμμωνίου, ενώ η μεταβολή της συγκέντρωσης του άλατος δεν έχει σημαντική επίδραση στις τιμές του παράγοντα T_f .

Πίνακας 3.1.2.1: Επίδραση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου στη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών.

Ένωση	Παράγοντας T_f			
	HCOONH ₄ 2 mM	HCOONH ₄ 5 mM	HCOONH ₄ 10 mM	HCOONH ₄ 20 mM
Μαννοζάνη	1,2	1,1	1,1	1,1
Λεβογλυκοζάνη	1,2	1,2	1,2	1,0
Ερυθριτόλη	1,2	1,1	1,0	1,1
Ξυλιτόλη	1,0	1,2	1,1	-
Αραβιτόλη	1,0	1,2	1,2	-
Μαννόζη	1,4	1,3	1,3	-
Μαννιτόλη	1,1	1,1	1,2	-
Ινοσιτόλη	1,4	1,3	1,3	-

Σημαντική όμως επίδραση στην επιλογή της βέλτιστης συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου είχε ο λόγος σήμα-προς-θόρυβο (S/N). Έχει αποδειχθεί από προηγούμενη μελέτη ότι αύξηση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου προκαλεί αύξηση του λόγου σήμα-προς-θόρυβο (S/N) και κατά συνέπεια και της ευαισθησίας του ανιχνευτή. Αυτό συμβαίνει γιατί η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός είναι ανάλογη με το μέγεθος των σωματιδίων του αναλύτη και η παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης άλατος πιθανώς αυξάνει και το μέγεθος των σωματιδίων [Karatapanis, *et al.*, 2011b]. Έτσι, η συγκέντρωση του μυρμηκικού αμμωνίου που τελικά επιλέγεται είναι ίση με 10 mM. Η συγκέντρωση των 20 mM απορρίπτεται λόγω του αυξημένου θορύβου (N), ο οποίος παρεμποδίζει την ανάλυση, αλλά και της αυξημένης κατακράτησης.

Το μυρμηκικό αμμώνιο στην κινητή φάση σε συγκέντρωση 10 mM συγκρίθηκε με μια κινητή φάση ίδιας συγκέντρωσης (10 mM) μυρμηκικού οξέος σε pH 3,0 διατηρώντας την ίδια αναλογία διαλυτών έκλουσης. Οι χρόνοι κατακράτησης των σακχάρων και η συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών ως συνάρτηση της παρουσίας διαφορετικών ρυθμιστικών παραγόντων, HCOONH_4 και HCOOH στην κινητή φάση, παρατίθενται στον Πίνακα 3.1.2.2.

Πίνακας 3.1.2.2: Επίδραση της παρουσίας διαφορετικών ρυθμιστικών παραγόντων, HCOONH_4 και HCOOH στην κινητή φάση, στο χρόνο κατακράτησης (t_R) και τη συμμετρία (T_f) των χρωματογραφικών κορυφών.

Ένωση	HCOONH_4		HCOOH	
	t_R (min)	T_f	t_R (min)	T_f
μαννοζάνη	4,261	1,1	3,640	1,1
λεβογλυκοζάνη	4,830	1,2	3,863	1,1
ερυθρίτολη	7,965	1,0	5,579	1,0
Ξυλιτόλη	11,356	1,1	6,928	1,1
αραβιτόλη	11,876	1,2	7,163	1,1
Μαννόζη	15,444	1,3	8,528	1,0
μαννιτόλη	17,193	1,2	9,534	1,1
ινοσιτόλη	34,821	1,3	15,542	1,1
σακχαρόζη	-	-	17,844	1,1

Συγκέντρωση ρυθμιστικών παραγόντων: 10 mM, pH 3,0

Από τον παραπάνω πίνακα είναι εμφανής η μείωση των χρόνων κατακράτησης των σακχάρων στη στήλη της διόλης-πυριτίας, παρουσία HCOOH στην κινητή φάση σε σχέση με το HCOONH_4 , αλλά και η επακόλουθη βελτιωμένη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών. Ωστόσο, παρά τους μικρούς χρόνους κατακράτησης που παρουσιάζει η αντικατάσταση του άλατος στην κινητή φάση από το μυρμηκικό οξύ, η R_s της στήλης ως προς τα σάκχαρα παρέμεινε ικανοποιητική, ειδικά για τα ζεύγη μαννοζάνη/λεβογλυκοζάνη ($R_s=1,28$) και ξυλιτόλη/αραβιτόλη ($R_s= 0,89$) (Πίνακας 3.1.2.3).

Πίνακας 3.1.2.3: Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα σακχάρων σε αναλογία διαλυτών 90/10 ACN/ H₂O (v/v) (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.1.2).

Ζεύγος ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα, R_s
	ACN/H ₂ O 90/10
μαννοζάνη / λεβογλυκοζάνη	1,28
λεβογλυκοζάνη/ ερυθριτόλη	7,21
ερυθριτόλη / ξυλιτόλη	4,22
ξυλιτόλη / αραβιτόλη	0,89
αραβιτόλη / μαννόζη	3,58
μαννόζη / μαννιτόλη	2,58
μαννιτόλη / ινοσιτόλη	10,90
ινοσιτόλη / σακχαρόζη	2,27

Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): $R_s \approx 1,50$

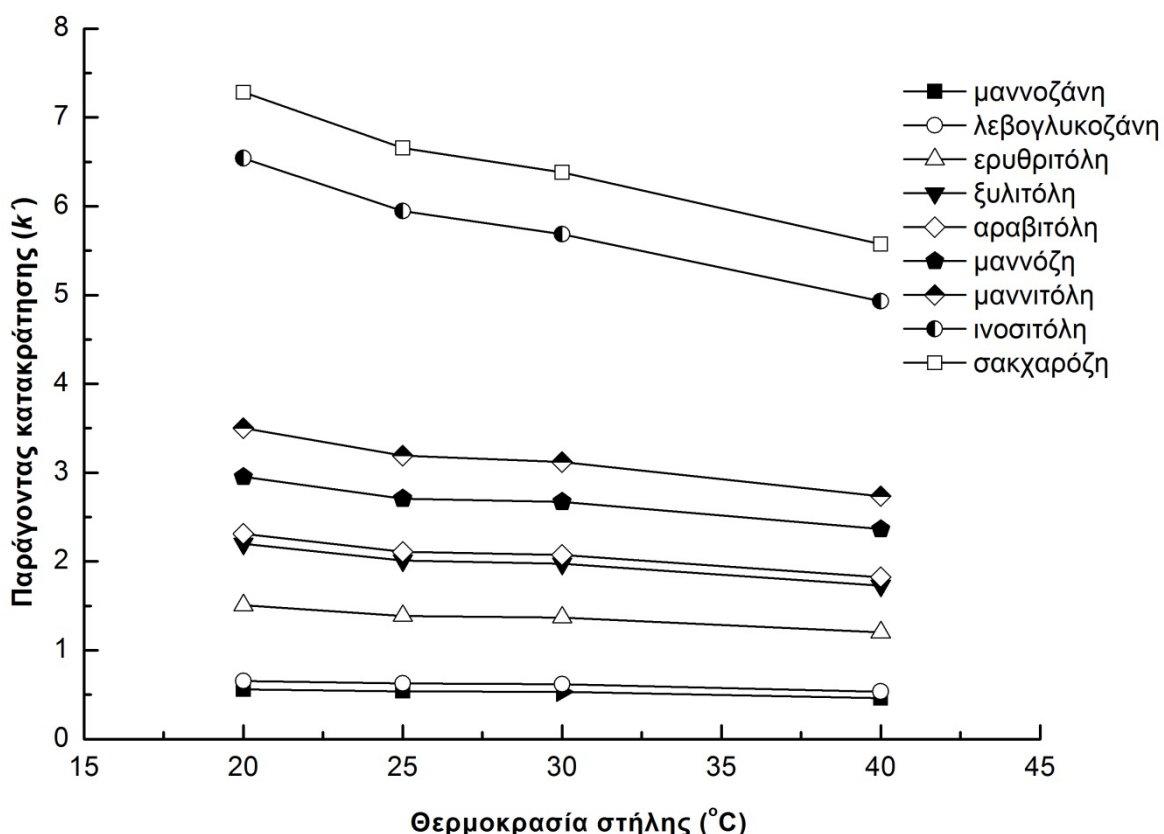
Επίσης, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η παρουσία του μυρμηκικού οξέος στην κινητή φάση μείωσε σημαντικά τον θόρυβο της χρωματογραφικής ανάλυσης, υπό τις ίδιες συνθήκες λειτουργίας του ανιχνευτή. Συγκεκριμένα, ο λόγος σήματος προς θόρυβο (S/N) είναι σχεδόν 10 φορές μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο σε κινητή φάση που περιέχει μυρμηκικό αμμώνιο. Η συμπεριφορά αυτή είναι πιθανό να οφείλεται στην απουσία των ιόντων αμμωνίου και μυρμηκικών ιόντων [HCOO⁻ NH₄⁺], καθώς και συμπλόκων τους στα προς ανίχνευση σταγονίδια που σχηματίζονται στον ανιχνευτή (dissolvation droplets).

Για τη βελτιστοποίηση του χρωματογραφικού διαχωρισμού έγιναν περαιτέρω πειράματα με την κινητή φάση να αποτελείται από μυρμηκικό οξύ σε συγκεντρώσεις 10 και 20 mM. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων και με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, η κινητή φάση που επιλέχτηκε αποτελούνταν από ACN/H₂O σε αναλογία διαλυτών 90/10 (v/v) που περιέχει 10 mM μυρμηκικό οξύ, με pH 3,0.

3.1.3. Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης

Η επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης στο χρόνο κατακράτησης των σακχάρων μελετήθηκε μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία από τους 20 έως τους 40 °C. Η σύσταση της κινητής φάσης, αποτελούμενη από ACN/H₂O 90/10 (v/v) με pH 3,0, διατηρήθηκε σταθερή στο εξεταζόμενο εύρος θερμοκρασίας. Η αύξηση της θερμοκρασίας έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου κατακράτησης όλων των υπό μελέτη ενώσεων. Δραστική

είναι η μείωση στο χρόνο κατακράτησης της σακχαρόζης ($7,28 < k' < 5,57$) και της ινοσιτόλης ($6,54 < k' < 4,93$), ενώ το φαινόμενο είναι λιγότερο αισθητό στις υπόλοιπες ενώσεις (Σχήμα 3.1.3.1). Πολύ μικρή μείωση της κατακράτησης παρατηρείται στα άνυδρο-σάκχαρα με τον συντελεστή κατακράτησης να κυμαίνεται μεταξύ $0,56 < k' < 0,46$, για τη μαννοζάνη και $0,65 < k' < 0,53$ μονάδες για τη λεβογλυκοζάνη. Με την αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης, οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των σακχάρων και της επιφάνειας της ενυδατωμένης σιβάδας, εξασθενούν με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η κατακράτησή τους από τη στήλη [Alpert, 1990, Modig, et al., 2003].



Σχήμα 3.1.3.1: Γραφική απεικόνιση της επίδρασης της θερμοκρασίας της στήλης διόλης-πυριτίας στον παράγοντα κατακράτησης των σακχάρων και σε αναλογία διαλύτη έκλουσης ACN/H₂O 90/10 (v/v). Η κινητή φάση περιέχει HCOOH 10 mM και σε pH 3,0. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.1.1.1.

Η μείωση της κατακράτησης των ενώσεων με την αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί, αντίστοιχα, μείωση και στη διαχωριστική ικανότητα της στήλης (R_s) (Πίνακας 3.1.3.1). Η επίδραση αυτή είναι εμφανής στα παρακάτω ζεύγη ενώσεων, για το εύρος θερμοκρασίας $T=20-40$ °C, με τις τιμές της διαχωριστικής ικανότητας να μειώνονται αρκε-

τά ως προς τα ζεύγη των ισομερών ενώσεων μαννοζάνη/λεβογλυκοζάνη ($R_s = 0,87$) και ξυλιτόλη/αραβιτόλη ($R_s = 0,57$) σε θερμοκρασία $T = 40^\circ\text{C}$. Για το λόγο αυτό, η θερμοκρασία $T = 30^\circ\text{C}$ θεωρείται βέλτιστη με τις τιμές της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης να είναι $R_s = 1,28$ για το ζεύγος μαννοζάνη/λεβογλυκοζάνη και $R_s = 0,89$ αντίστοιχα, για το ζεύγος ξυλιτόλη/αραβιτόλη.

Πίνακας 3.1.3.1: Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα σακχάρων στο εύρος θερμοκρασιών $20\text{--}40^\circ\text{C}$ και αναλογία διαλύτη έκλουσης ACN/ H_2O 90/10 (v/v). Η κινητή φάση περιέχει HCOOH 10 mM σε pH 3,0 (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.1.1.1).

Ζεύγος ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα, R_s			
	$T = 20^\circ\text{C}$	$T = 25^\circ\text{C}$	$T = 30^\circ\text{C}$	$T = 40^\circ\text{C}$
μαννοζάνη / λεβογλυκοζάνη	1,40	1,37	1,28	0,87
λεβογλυκοζάνη/ ερυθριτόλη	8,20	7,68	7,21	6,95
ερυθριτόλη / ξυλιτόλη	5,11	3,96	4,22	3,45
ξυλιτόλη / αραβιτόλη	1,02	0,98	0,89	0,57
αραβιτόλη / μαννόζη	3,64	3,60	3,58	3,03
μαννόζη / μαννιτόλη	3,16	3,01	2,58	2,42
μαννιτόλη / ινοσιτόλη	12,21	12,20	10,90	11,08
ινοσιτόλη / σακχαρόζη	2,51	2,25	2,27	2,59

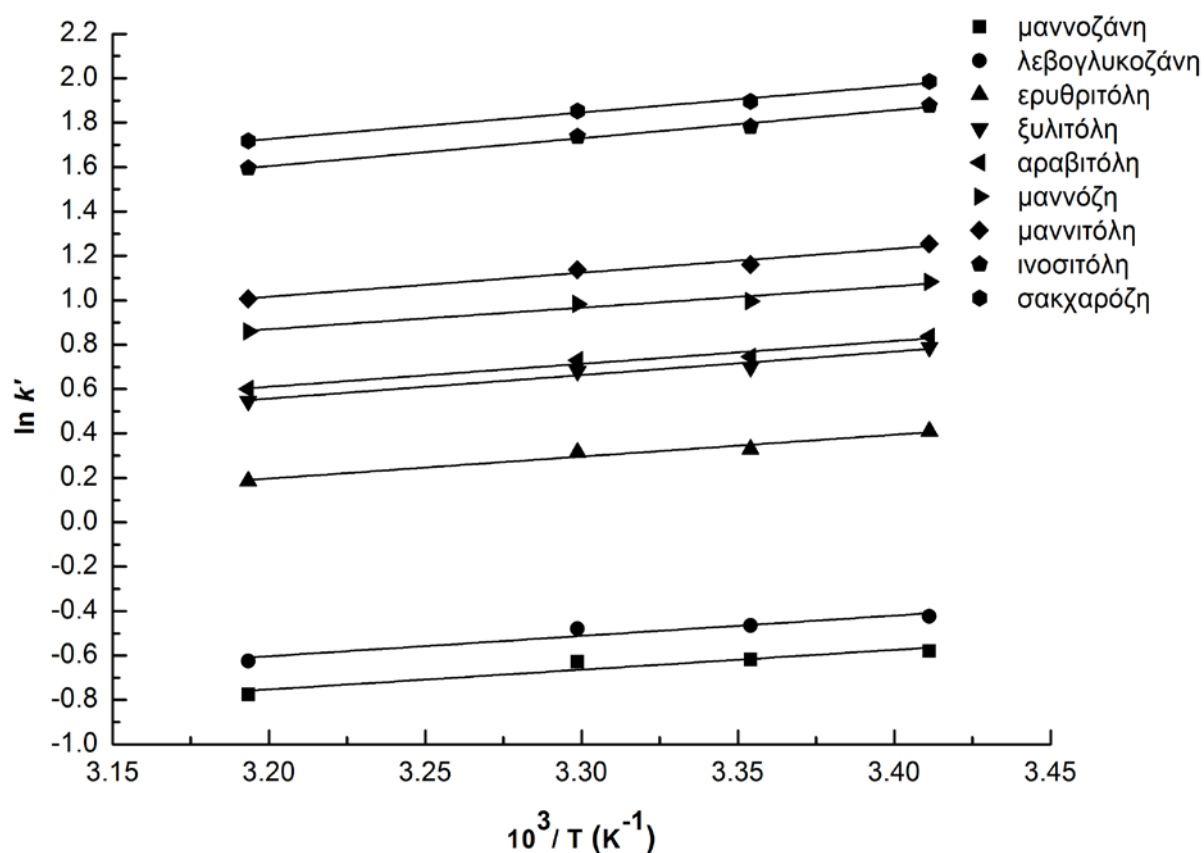
Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): $R_s \approx 1,50$

Η θερμοκρασία της στήλης είναι μια από τις σημαντικές παραμέτρους στην HPLC διότι επηρεάζει φυσικοχημικές παραμέτρους, όπως είναι το ιξώδες της κινητής φάσης, ο συντελεστής διάχυσης, η ενθαλπία μεταφοράς των μορίων ενός αναλύτη μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης και η μεταβολή της εντροπίας των μορίων κατά την αλληλεπίδρασή τους με τη στατική φάση, οι οποίες σχετίζονται άμεσα με το χρόνο κατακράτησης μιας ένωσης. Στην RPLC η σχέση που συνδέει τον παράγοντα κατακράτησης (k') μιας ένωσης με τη θερμοκρασία (T) περιγράφεται από την εξίσωση van't Hoff:

$$\ln k' = - \frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \varphi \quad (3.1)$$

όπου: ΔH° και ΔS° , η μεταβολή της ενθαλπίας και της εντροπίας μιας ένωσης κατά τη μεταφορά της από την κινητή στη στατική φάση, R , η παγκόσμια σταθερά των αερίων και φ , ο λόγος των φάσεων (ο λόγος του όγκου της στατικής φάσης προς τον όγκο της κινητής φάσης) [Scott, 2003].

Υποθέτοντας ότι ο μηχανισμός στην HILIC λαμβάνει μέσω κατανομής, η εξίσωση van't Hoff θα πρέπει να έχει γραμμική απόκριση [Poole, 2003]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της γραφικής απεικόνισης της εξίσωσης van't Hoff (Σχήμα 3.1.3.2, Πίνακας 3.1.3.2) υπάρχει αποδεκτή γραμμική συσχέτιση για το σύνολο των χρωματογραφικών κορυφών ($0,9002 < R^2 < 0,9870$) στο εύρος θερμοκρασίας που μελετώνται. Η ύπαρξη γραμμικής συσχέτισης είναι κάτι το οποίο ισχύει συνήθως και στην RPLC, υποδεικνύοντας ότι η κατανομή είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός κατακράτησης των ενώσεων.



Σχήμα 3.1.3.2: Γραφική απεικόνιση της εξίσωσης van't Hoff για το εύρος θερμοκρασίας 20-40 °C σε αναλογία διαλύτη έκλουσης ACN/H₂O 90/10 (v/v). Η κινητή φάση περιέχει HCOOH 10 mM και σε pH 3,0. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.1.1.1.

Στην HILIC, μικρή απόκλιση από τη γραμμικότητα στην εξίσωση van't Hoff μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη ενός "μικτού" μηχανισμού με τη συμμετοχή πολλών παραμέτρων [Quiming, *et al.*, 2008, Scott, 2003, Wu, *et al.*, 2008]. Η εξήγηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με τον Alpert (1990) σύμφωνα με τον οποίο η κατακράτηση των πολικών ενώσεων, πέραν της κατανομής, καθορίζεται από ένα συνδυασμό αλληλεπιδράσεων με τη

μορφή επιμέρους μηχανισμών όπως είναι η ανταλλαγή ιόντων και οι δεσμοί υδρογόνου και διπόλου-διπόλου.

Οι τιμές ενθαλπίας για το σύνολο των ενώσεων έχουν αρνητική τιμή και κυμαίνονται από -7,48 σε -8,20 kJ/mol, το οποίο σημαίνει ότι η κατακράτηση των ενώσεων είναι μια εξώθερμη διεργασία (ενεργειακά αυθόρμητη) και μειώνεται αυξάνοντας τη θερμοκρασία της στήλης [Guo, 2005, Guo, *et al.*, 2005].

Πίνακας 3.1.3.2: Τιμές των συντελεστών γραμμικής συσχέτισης, της ενθαλπίας και του λόγου $\Delta S^\circ/R$ της εξίσωσης van't Hoff.

Ένωση	ACN/H ₂ O 90/10		
	R^2	ΔH° (kJ/mol)	$\Delta S^\circ/R$
Μαννοζάνη	0,8978	-7,48	-3,61
Λεβογλυκοζάνη	0,9002	-7,62	-3,54
Ερυθριτόλη	0,9474	-7,88	-2,96
Ξυλιτόλη	0,9529	-7,92	-2,83
Αραβιτόλη	0,9491	-7,89	-2,69
Μαννόζη	0,9454	-7,86	-2,23
Μαννιτόλη	0,9618	-8,00	-2,45
Ινοσιτόλη	0,9861	-8,20	-2,43
Σακχαρόζη	0,9857	-8,20	-2,09

Συγκέντρωση ρυθμιστικών παραγόντων: 10 mM, pH 3,0

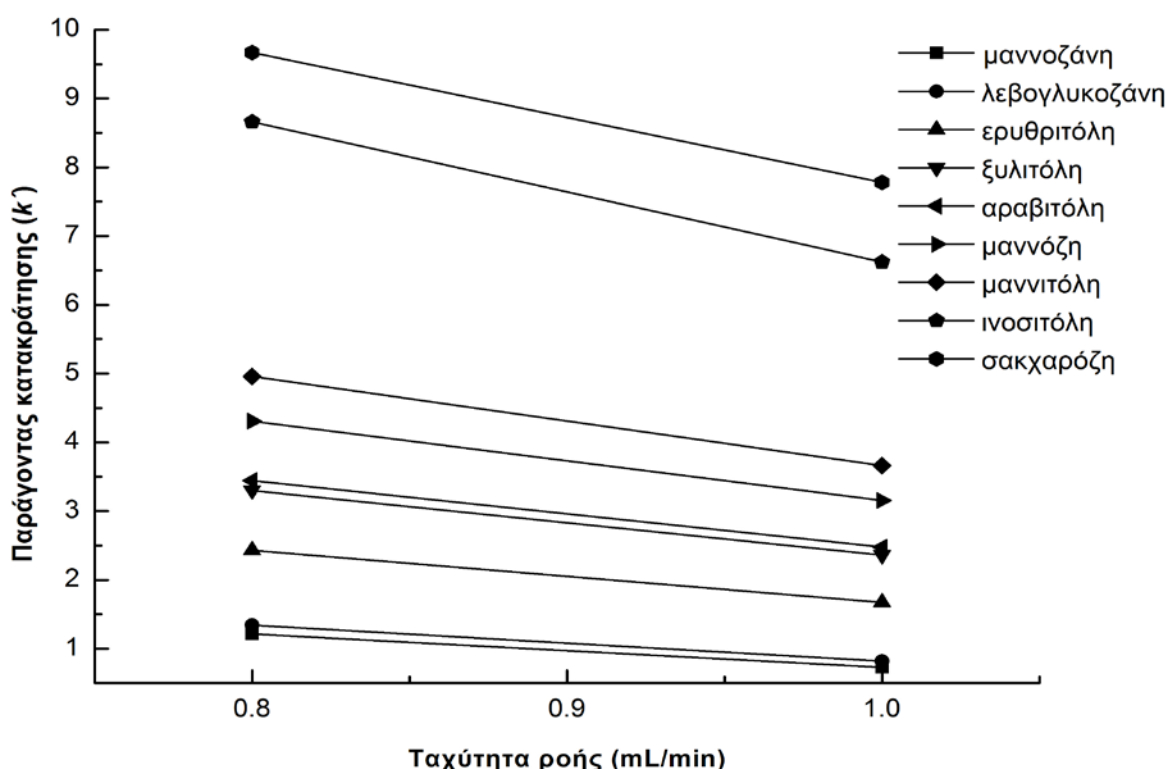
Με βάση, λοιπόν, την επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης στη διαχωριστική ικανότητα στο μίγμα των σακχάρων στο εξεταζόμενο εύρος θερμοκρασιών και την απόκριση του ανιχνευτή ELSD, η θερμοκρασία στήλης $T=30^\circ\text{C}$ επιλέγεται ως η βέλτιστη για τον διαχωρισμό του μίγματος των σακχάρων.

3.1.4. Επίδραση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης

Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της HILIC είναι το χαμηλό ιξώδες της κινητής φάσης, λόγω της παρουσίας οργανικού διαλύτη σε υψηλά ποσοστά (>70%, (v/v)), το οποίο επιτρέπει την εφαρμογή υψηλών ροών [McCalley, 2007]. Εντούτοις, η αύξηση της ροής της κινητής φάσης πάνω από ένα όριο έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των θεωρητικών πλακών, N (ή την αύξηση του ύψους ισοδύναμου με μια θεωρητική πλάκα, Height Equivalent to one Theoretical Plate, *HETP*) και κατά συνέπεια τη σταδιακή απώλεια της απόδοσης της στήλης [Pack, *et al.*, 2005]. Επομένως, η βελτιστοποίηση ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού είναι μια "ισορροπία" μεταξύ της εκλεκτικότητας, της τα-

χύτητας, αλλά και της διαχωριστικής ικανότητας για μια δεδομένη ανάλυση [Appelblad, *et al.*, 2008].

Στο Σχήμα 3.1.4 παρατίθενται οι παράγοντες κατακράτησης (k') των σακχάρων ως συνάρτηση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης. Όπως είναι αναμενόμενο, η μείωση του χρόνου κατακράτησης των ενώσεων είναι ανάλογη με την αύξηση της ροής της κινητής φάσης [Pack, *et al.*, 2005].



Σχήμα 3.1.4: Επίδραση του παράγοντα κατακράτησης (k') των σακχάρων ως συνάρτηση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης, σε αναλογία διαλύτη έκλουσης ACN/H₂O 90/10 (v/v). Η κινητή φάση περιέχει HCOOH 10 mM και σε pH 3,0. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.1.1.1.

Η αύξηση της ροής της κινητής φάσης από 0,8 στα 1,0 mL/min έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση του συνολικού χρόνου ανάλυσης του μίγματος από τα 18 min στα 15 min. Ταυτόχρονα όμως, λόγω της ελάττωσης του *HETP* της στήλης, λαμβάνει χώρα μείωση της διαχωριστικής ικανότητας στο μίγμα των σακχάρων. Οι τιμές της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης απεικονίζονται στον Πίνακα 3.1.4.

Πίνακας 3.1.4: Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα σακχάρων σε ροή κινητής φάσης 0,8 και 1,0 mL/min και αναλογία διαλύτη έκλουσης ACN/H₂O 90/10 (v/v). Η κινητή φάση περιέχει HCOOH 10 mM σε pH 3,0 (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.1.1.1).

Ζεύγος ενώσεων	Διαχωριστική ικανότητα, R_s	
	0,8 mL/min	1,0 mL/min
μαννοζάνη / λεβογλυκοζάνη	1,28	0,95
λεβογλυκοζάνη/ ερυθριτόλη	7,21	6,81
ερυθριτόλη / ξυλιτόλη	4,22	3,62
ξυλιτόλη / αραβιτόλη	0,89	0,59
αραβιτόλη / μαννόζη	3,58	2,90
μαννόζη / μαννιτόλη	2,58	2,31
μαννιτόλη / ινοσιτόλη	10,90	10,50
ινοσιτόλη / σακχαρόζη	2,27	1,92

Διαχωρισμός στη γραμμή βάσης (baseline resolution): $R_s \approx 1,50$

Από τον Πίνακα 3.1.4 είναι σαφές ότι σε ροή κινητής φάσης 1,0 mL/min, η διαχωριστική ικανότητα των ζευγών των ισομερών σακχάρων, μαννοζάνη/λεβογλυκοζάνη και ξυλιτόλη/αραβιτόλη, μειώνεται αρκετά με αποτέλεσμα τον ατελή διαχωρισμό τους. Για το λόγο αυτό, η ταχύτητα ροής κινητής φάσης που τελικά επιλέγεται είναι ίση προς 0,8 mL/min. Τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν τη δυνατότητα της HILIC για γρήγορη ανάλυση πολικών ενώσεων, όπως τα σάκχαρα, με ικανοποιητικό διαχωρισμό, υπό ισοκρατικές συνθήκες έκλουσης.

3.1.5. Επίδραση των παραμέτρων του ανιχνευτή σκέδασης φωτός, ELSD

Οι παράμετροι του ανιχνευτή σκέδασης φωτός, ELSD οι οποίοι επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά ποιότητας ενός χρωματογραφικού προσδιορισμού είναι η θερμοκρασία εξάτμισης της κινητής φάσης, η ευαισθησία (gain) και η πίεση του φέροντος αερίου (στην προκείμενη περίπτωση του αζώτου).

Στον ELSD η ποσότητα του σκεδαζόμενου φωτός εξαρτάται όχι μόνο από τον αριθμό αλλά και από το μέγεθος και το σχήμα των σωματιδίων τα οποία επηρεάζονται με τη σειρά τους από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των σακχάρων, την κινητή φάση, τη θερμοκρασία εξάτμισης της κινητής φάσης και τη ροή του φέροντος αερίου [Karatapanis, *et al.*, 2011b].

Οι παράμετροι του ELSD δεν επηρεάζουν σημαντικά το χρωματογραφικό διαχωρισμό (συγκριτικά με τις υπόλοιπες παραμέτρους που μελετήθηκαν) αλλά επηρεάζουν κυρίως το λόγο του σήματος προς το θόρυβο (S/N) και επομένως την ανιχνευσιμότητα και την ευαισθησία των χρωματογραφικών προσδιορισμών.

Αύξηση της θερμοκρασίας εξάτμισης του ELSD συνεπάγεται μείωση του θορύβου, εξαιτίας της αποτελεσματικότερης εξάτμισης της κινητής φάσης, ταυτόχρονα όμως παρατηρείται μείωση της απόκρισης κατά την έκλουση των υπό προσδιορισμό ουσιών. Αντίθετα αποτελέσματα επιφέρει η μείωση της θερμοκρασίας [Megoulas, *et al.*, 2005]. Για την επιλογή της βέλτιστης θερμοκρασίας εξάτμισης της κινητής φάσης επιλέγεται η θερμοκρασία εκείνη που αποδίδει τη μεγαλύτερη απόκριση των κορυφών (S), επιτυγχάνοντας παράλληλα το μικρότερο θόρυβο στη γραμμή βάσης (N) και στην οποία αποκρίνονται όλες οι υπό προσδιορισμό ενώσεις.

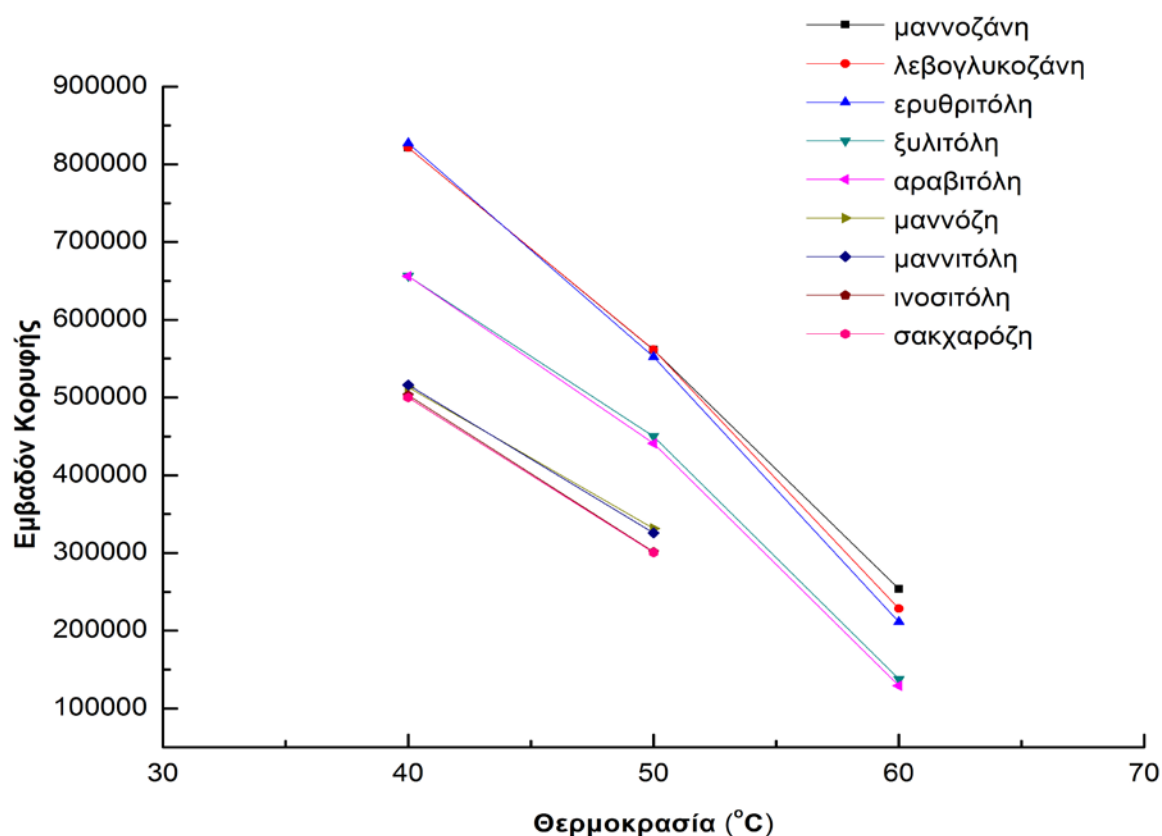
Η ευαισθησία του ELSD ελέγχει την ενίσχυση του σήματος του ανιχνευτή (φωτοπολλαπλασιαστής) ώστε να εξασφαλισθεί η ανίχνευση των μικρών κορυφών. Αλλά η αύξηση αυτή της ευαισθησίας του ανιχνευτή δεν ενισχύει μόνο το σήμα, αλλά και τον θόρυβο. Ως εκ τούτου, η ευαισθησία του ανιχνευτή που δίνει την αναλυτική πληροφορία είναι αυτή που αποδίδει το μέγιστο λόγο του σήματος προς θόρυβο (S/N).

Η ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου επηρεάζει τη διαδικασία εκνέφωσης της κινητής φάσης, το μέγεθος και την ταχύτητα μεταφοράς των δημιουργούμενων σωματιδίων. Χαμηλή πίεση φέροντος αερίου συνεπάγεται αφενός μεν ατελή εκνέφωση της κινητής φάσης και αφετέρου την απομάκρυνση ποσοστού των δημιουργούμενων σωματιδίων πριν το στάδιο της μέτρησης, εξαιτίας της βαρύτητας. Ωστόσο, επισημαίνεται ότι η αύξηση της πίεσης του φέροντος αερίου πέραν από κάποια τιμή, συνεπάγεται μείωση της απόκρισης του ανιχνευτή, εξαιτίας της μείωσης της διαμέτρου των σωματιδίων, ενώ ταυτόχρονα συνεπάγεται υψηλή κατανάλωση αερίου και επομένως αυξημένο κόστος.

Χρησιμοποιώντας, λοιπόν, τις βελτιστοποιημένες χρωματογραφικές συνθήκες ανάλυσης μελετάται η επίδραση της θερμοκρασίας που αναπτύσσεται στο θερμαινόμενο σωλήνα πλάγιας μετατόπισης (θερμοκρασία εξάτμισης), η ευαισθησία ($gain$) και η πίεση του φέροντος αερίου στο εμβαδό των χρωματογραφικών κορυφών των σακχάρων.

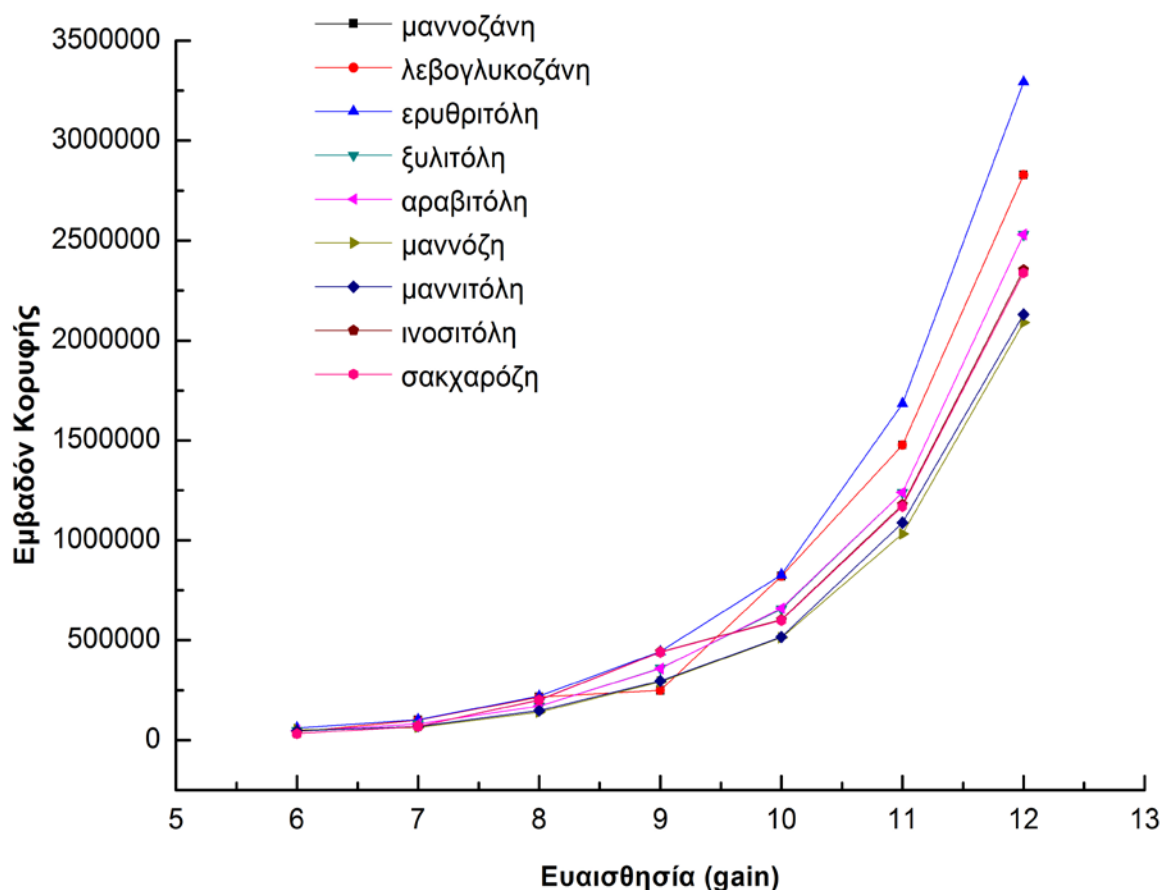
Στο πρώτο στάδιο, μελετάται η επίδραση της θερμοκρασίας εξάτμισης στο εμβαδό των χρωματογραφικών κορυφών των σακχάρων. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιούνται μετρήσεις προτύπων διαλυμάτων σακχάρων συγκέντρωσης 20 $\mu g/mL$ στο εύρος θερμοκρασίας 40-60 $^{\circ}C$ και σε πίεση 3,4 L/min . Όπως προκύπτει από τα δεδομένα του Σχήματος 3.1.5.1, το μέγιστο εμβαδόν στις χρωματογραφικές κορυφές παρουσιάζεται σε θερμοκρασία εξάτμισης 40 $^{\circ}C$. Από τα παραπάνω, διαπιστώνεται ότι στους 40 $^{\circ}C$ επιτυγχάνεται η μεγαλύτερη απόκριση του ανιχνευτή ενώ στους 60 $^{\circ}C$ η μικρότερη. Επομένως, αύξηση

της θερμοκρασίας του ανιχνευτή προκαλεί μείωση στο εμβαδόν της κορυφής και κατά συνέπεια μείωση της απόκρισης του ανιχνευτή που συνεπάγεται μείωση του λόγου σήμα προς θόρυβο (S/N). Έτσι, η βέλτιστη θερμοκρασία εξάτμισης που επιλέγεται με βάση τα παραπάνω είναι ίση με 40 °C.



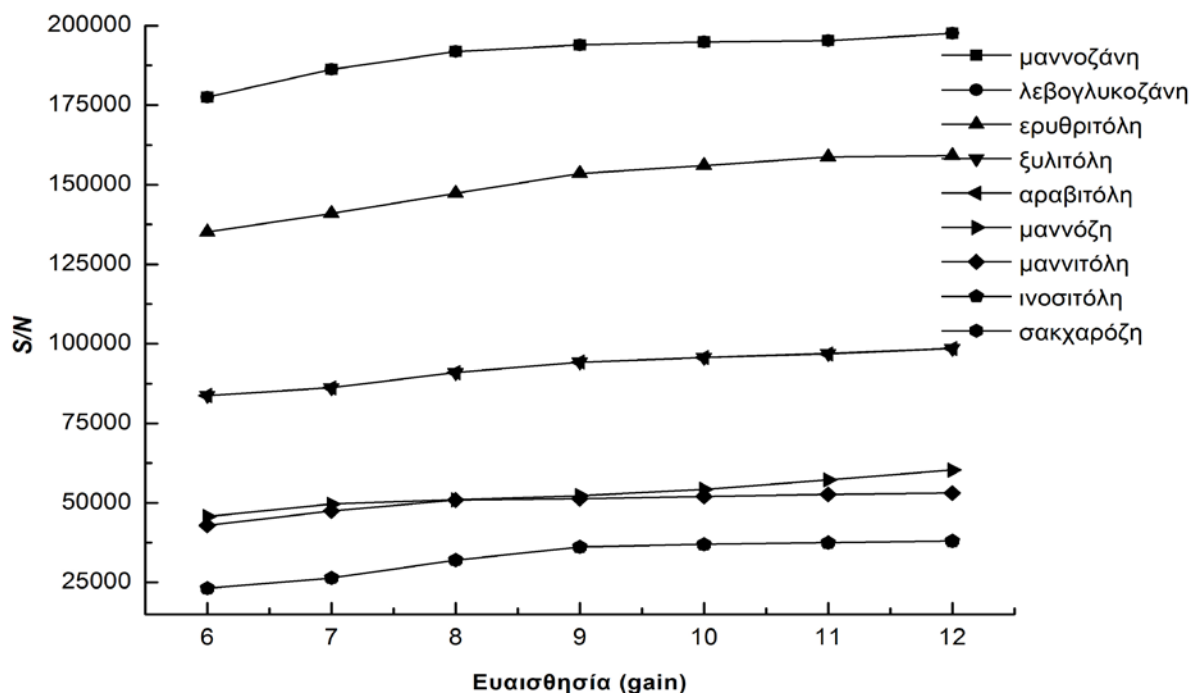
Σχήμα 3.1.5.1: Επίδραση της θερμοκρασίας εξάτμισης της κινητής φάσης στο εμβαδόν των χρωματογραφικών κορυφών των σακχάρων, σε αναλογία διαλύτη έκλουσης ACN/H₂O 90/10 (v/v). Η κινητή φάση περιέχει HCOOH 10 mM και σε pH 3,0. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.1.1.1.

Στο δεύτερο στάδιο, μελετάται η επίδραση της ευαισθησίας (gain) του ανιχνευτή στο εμβαδό των χρωματογραφικών κορυφών των σακχάρων. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιούνται μετρήσεις προτύπων διαλυμάτων σακχάρων συγκέντρωσης 20 μg/mL στο εύρος ευαισθησίας (gain) 6-12 και σε πίεση 3,4 L/min. Η απόκριση του ανιχνευτή ως συνάρτηση της ευαισθησίας απεικονίζεται στο Σχήμα 3.1.5.2, από το οποίο προκύπτει ότι το μέγιστο εμβαδόν στις χρωματογραφικές κορυφές παρουσιάζεται σε τιμή ευαισθησίας (gain) 12.



Σχήμα 3.1.5.2: Επίδραση της ευαισθησίας (gain) του ανιχνευτή στο εμβαδόν των χρωματογραφικών κορυφών των σακχάρων, σε αναλογία διαλύτη έκλουσης ACN/H₂O 90/10 (v/v). Η κινητή φάση περιέχει HCOOH 10 mM και σε pH 3,0. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.1.1.1.

Από το Σχήμα 3.1.5.2 είναι σαφές ότι καθώς αυξάνει η ευαισθησία από την τιμή 6 έως την τιμή 12 προκαλείται αύξηση της απόκρισης του ανιχνευτή. Στο Σχήμα 3.1.5.3 απεικονίζεται ο λόγος σήμα προς θόρυβο (S/N) συναρτήσει της ευαισθησίας και διαπιστώνεται ότι αύξηση της ευαισθησίας προκαλεί αύξηση του λόγου σήμα προς θόρυβο (S/N). Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, επιλέγεται η τιμή 12 ως η βέλτιστη τιμή ευαισθησίας.



Σχήμα 3.1.5.3: Επίδραση της ευαισθησίας (gain) του ανιχνευτή στο λόγο σήμα προς θόρυβο (S/N) των σακχάρων, σε αναλογία διαλύτη έκλουσης ACN/H₂O 90/10 (v/v). Η κινητή φάση περιέχει HCOOH 10 mM και σε pH 3,0. Λοιπές χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.1.1.1.

Στο τελευταίο στάδιο της βελτιστοποίησης των παραμέτρων του ανιχνευτή μελετάται η επίδραση της ταχύτητας ροής του αερίου εκνέφωσης στην απόκριση του ανιχνευτή. Η ταχύτητα ροής του αερίου εκνέφωσης κυμαίνεται από 2,2 έως 3,4 L/min. Ωστόσο, δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στην απόκριση των χρωματογραφικών κορυφών. Έτσι, διαπιστώνεται ότι η απόκριση, και κατά συνέπεια και ο λόγος S/N, είναι πρακτικά ανεξάρτητα από την ταχύτητα ροής του αζώτου στο υπό μελέτη εύρος [Karatapanis, *et al.*, 2011b]. Για το λόγο αυτό, η ταχύτητα ροής του αερίου εκνέφωσης επιλέγεται στα 3,4 L/min σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή.

3.2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

3.2.1. Καμπύλες αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων σακχάρων

Οι καμπύλες αναφοράς παρασκευάζονται από εννέα πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 1000 mg/L σε ογκομετρικές φιάλες, χωρητικότητας 10 mL. Κατόπιν, με κατάλληλες αραιώσεις, παρασκευάζονται τα διαλύματα εργασίας διαφορετικών συγκεντρώσεων.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται πέντε επίπεδα συγκέντρωσης για κάθε σάκχαρο τα οποία αναλύονται τρεις φορές το κάθε ένα. Το εύρος συγκεντρώσεων των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής: μαννοζάνη από 1,0 έως 20,0 μg/mL, λεβογλυκοζάνη από 1,0 έως 20,0 μg/mL, ερυθριτόλη από 1,0 έως 20,0 μg/mL, ξυλιτόλη από 1,0 έως 20,0 μg/mL, αραβιτόλη από 1,0 έως 20,0 μg/mL, μαννόζη από 2,5 έως 30,0 μg/mL, μαννιτόλη από 2,5 έως 30,0 μg/mL, ινοσιτόλη από 5,0 έως 50,0 μg/mL και σακχαρόζη από 5,0 έως 50,0 μg/mL. Στον Πίνακα 3.2.1 παρουσιάζονται οι εξισώσεις της ευθείας, οι συντελεστές γραμμικής συσχέτισης αυτών, το εύρος γραμμικότητας, τα όρια ανίχνευσης ($S/N=3$) και ποσοτικοποίησης καθώς και η επαναληψιμότητα της μεθόδου. Τα παραπάνω διαλύματα αναλύονται στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιώντας τις συνθήκες που προκύπτουν από την βελτιστοποίηση.

Πίνακας 3.2.1: Εξισώσεις καμπύλων αναφοράς, εύρος γραμμικότητας, συντελεστές γραμμικής συσχέτισης, όρια ανίχνευσης και όρια ποσοτικοποίησης, επαναληψιμότητα της μεθόδου σε αναλογία διαλύτη έκλουσης ACN/H₂O 90/10 (v/v). Η κινητή φάση περιέχει HCOOH 10 mM σε pH 3,0 (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.1.1.1)

Ένωση	Εύρος Γραμμικότητας (μg/mL)*	Εξίσωση Ευθείας**	Συντελεστής Γραμμικής Συσχέτισης, R^2	Όριο Ανίχνευσης, LOD (μg/mL)	Όριο Ποσοτικο- ποίησης, LOQ (μg/mL)	% R.S.D. (n=3)
Μαννοζάνη	1,0-20,0	$y=1,40x+4,36$	0,9971	0,30	1,00	0,1
Λεβογλυκοζάνη	1,0-20,0	$y=1,44x+4,37$	0,9991	0,30	1,00	0,2
Ερυθριτόλη	1,0-20,0	$y=1,41x+4,40$	0,9987	0,30	1,00	0,1
Ξυλιτόλη	1,0-20,0	$y=1,39x+4,48$	0,9990	0,30	1,00	0,4
Αραβιτόλη	1,0-20,0	$y=1,36x+4,62$	0,9985	0,30	1,00	0,1
Μαννόζη	2,5-30,0	$y=1,25x+4,89$	0,9987	0,75	2,50	0,4
Μαννιτόλη	2,5-30,0	$y=1,21x+4,95$	0,9988	0,750	2,50	0,4
Ινοσιτόλη	5,0-50,0	$y=1,01x+5,19$	0,9974	1,500	5,00	1,4
Σακχαρόζη	5,0-50,0	$y=1,10x+5,02$	0,9947	1,500	5,00	1,3

* όγκος έγχυσης δείγματος, 20 μL

**Γραμμική εξίσωση παλινδρόμησης: $y = ax + b$, [$x = \log$ (εγγεόμενη μάζα, μg/mL), $y = \log$ (εμβαδόν κορυφής)]

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 3.2.1, η μέθοδος έχει πολύ καλή γραμμικότητα για το σύνολο των σακχάρων με τους συντελεστές γραμμικής συσχέτισης να κυμαίνονται από 0,9947 έως 0,9991.

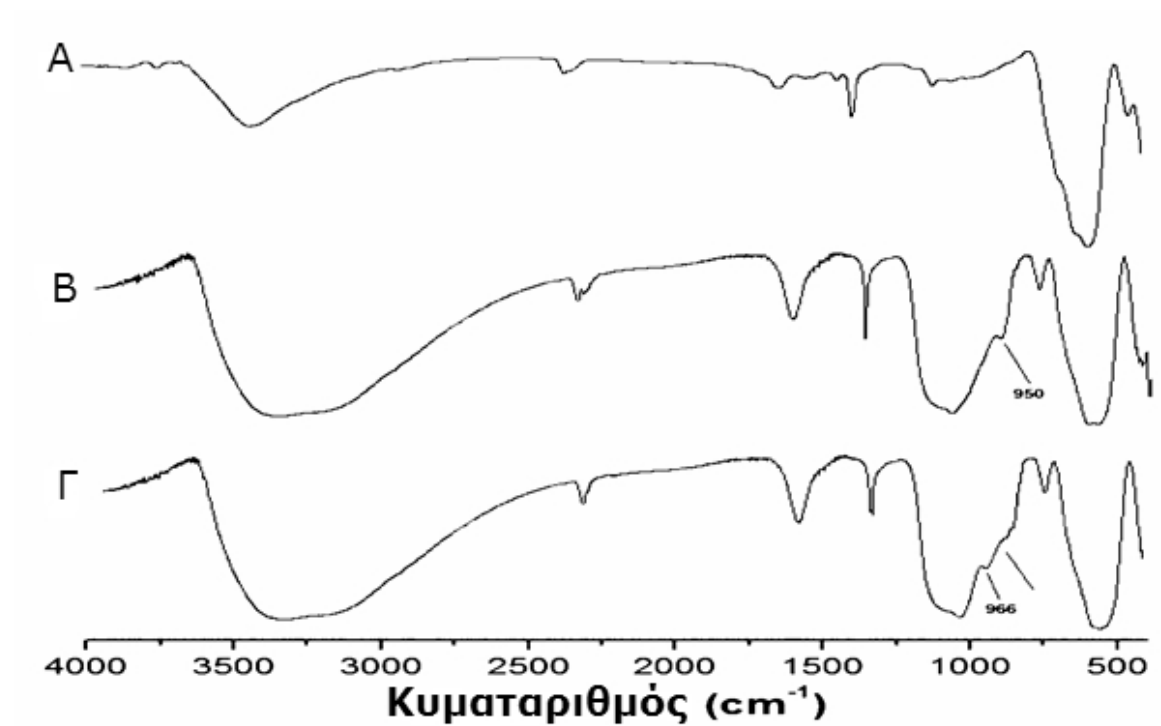
Τα όρια ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) της μεθόδου υπολογίζονται ως η τιμή συγκέντρωσης για την οποία το σήμα (S) του ανιχνευτή είναι τριπλάσιο του θορύβου (N) ($S/N = 3$) και κυμαίνεται μεταξύ 0,3 έως 1,5 $\mu\text{g/mL}$, ενώ τα όρια ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation, LOQ) της μεθόδου υπολογίζονται από την τιμή συγκέντρωσης για την οποία το σήμα του ανιχνευτή είναι δεκαπλάσιο του θορύβου ($S/N = 10$) και κυμαίνεται μεταξύ 1,0 έως 5,0 $\mu\text{g/mL}$, για τα υπό μελέτη σάκχαρα. Το LOQ της μεθόδου μετά την προσυγκέντρωση, για έναν όγκο 5 m^3 , κυμαίνεται από 30 έως 150 ng/m^3 .

Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων την ίδια ημέρα πραγματοποιείται με ανάλυση εννέα δειγμάτων (τρεις αναλύσεις για κάθε δείγμα). Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις στα πειράματα της ίδιας ημέρας, οι οποίες κυμαίνονται από 0,2 έως 1,4%, με την επαναληψιμότητα να κρίνεται πολύ ικανοποιητική.

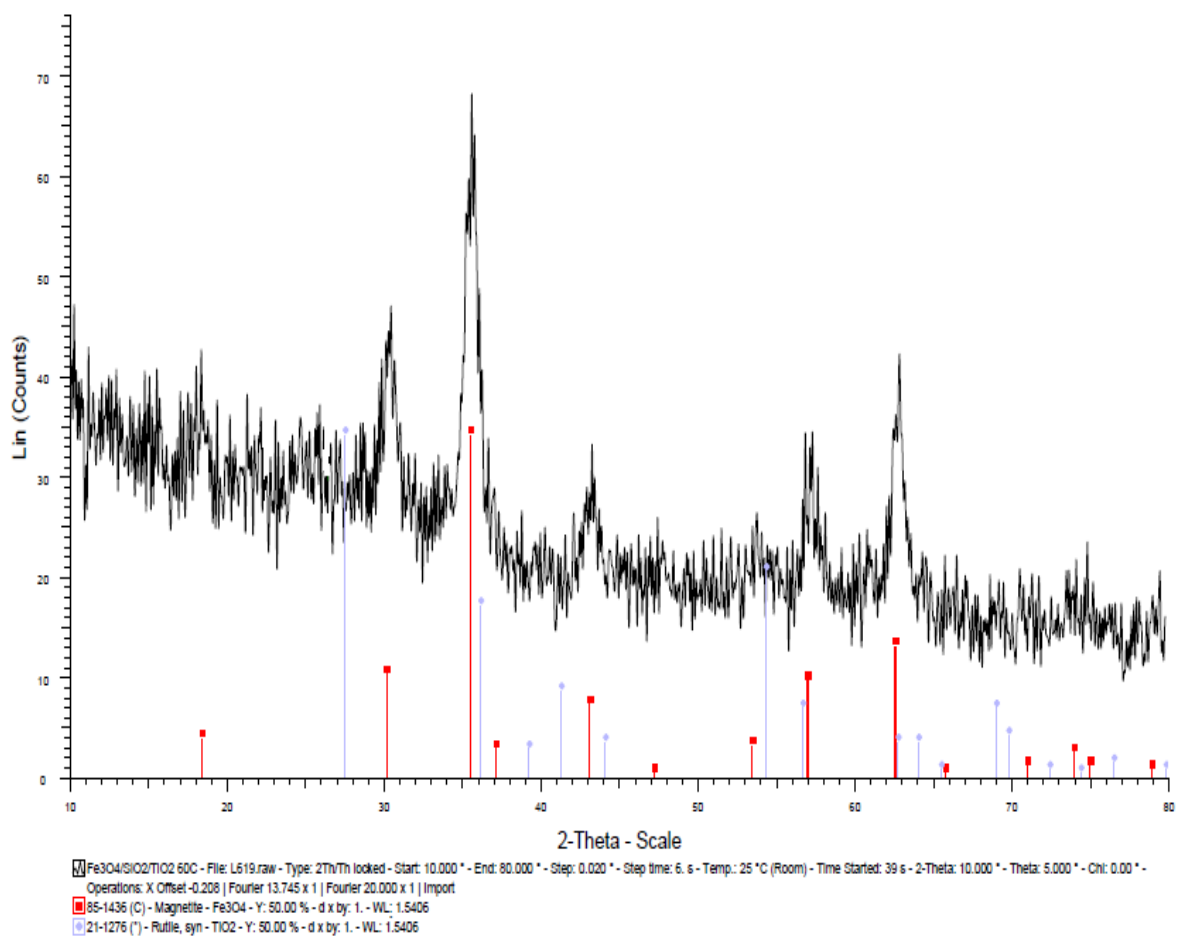
3.3. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΕ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$

3.3.1. Χαρακτηρισμός του μαγνητικών υλικού $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$

Τα σωματίδια τα οποία παρασκευάζονται μελετώνται ποιοτικά με φασματοσκοπία υπερύθρου. Στο Σχήμα 3.3.1 φαίνεται η ανάλυση FT-IR των δειγμάτων. Η κορυφή από 632 έως 535 cm^{-1} (Σχήμα 3.3.1A) είναι χαρακτηριστική κορυφή του μαγνητίτη (Fe_3O_4). Μετά την επικάλυψη της επιφάνειας του μαγνητίτη με διοξείδιο του πυριτίου (SiO_2), η κορυφή από 1110 έως 1000 cm^{-1} είναι χαρακτηριστική του δεσμού Si-O-Si, ο οποίος επιδεικνύει ισχυρή απορρόφηση, ενώ μια δεύτερη απορρόφηση παρατηρείται στα 950 cm^{-1} και οφείλεται στη δόνηση του δεσμού Si-O-H (Σχήμα 3.3.1B) [Chen, *et al.*, 2005]. Τέλος, στο Σχήμα 3.3.1Γ απεικονίζεται η απορρόφηση του υλικού οξειδίου του σιδήρου-πυριτίας-τιτανίας ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$). Η απορρόφηση στα 966 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις των δεσμών Si-O-H και Ti-O-Si, υποδεικνύοντας έτσι ότι η κορυφή της δόνησης του δεσμού Si-OH μετακινείται σε μεγαλύτερους κυματάρθρους παρουσία των δεσμών Ti-O-Si στο υλικό [Kotani, *et al.*, 2001]. Περαιτέρω πληροφορίες για το υλικό $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ παρέχονται από το διάγραμμα περίθλασης ακτίνων-X, XRD.



Σχήμα 3.3.1: Διαγράμματα FT-IR, (Α) μαγνητίτη, Fe_3O_4 , (Β) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$, (Γ) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$.

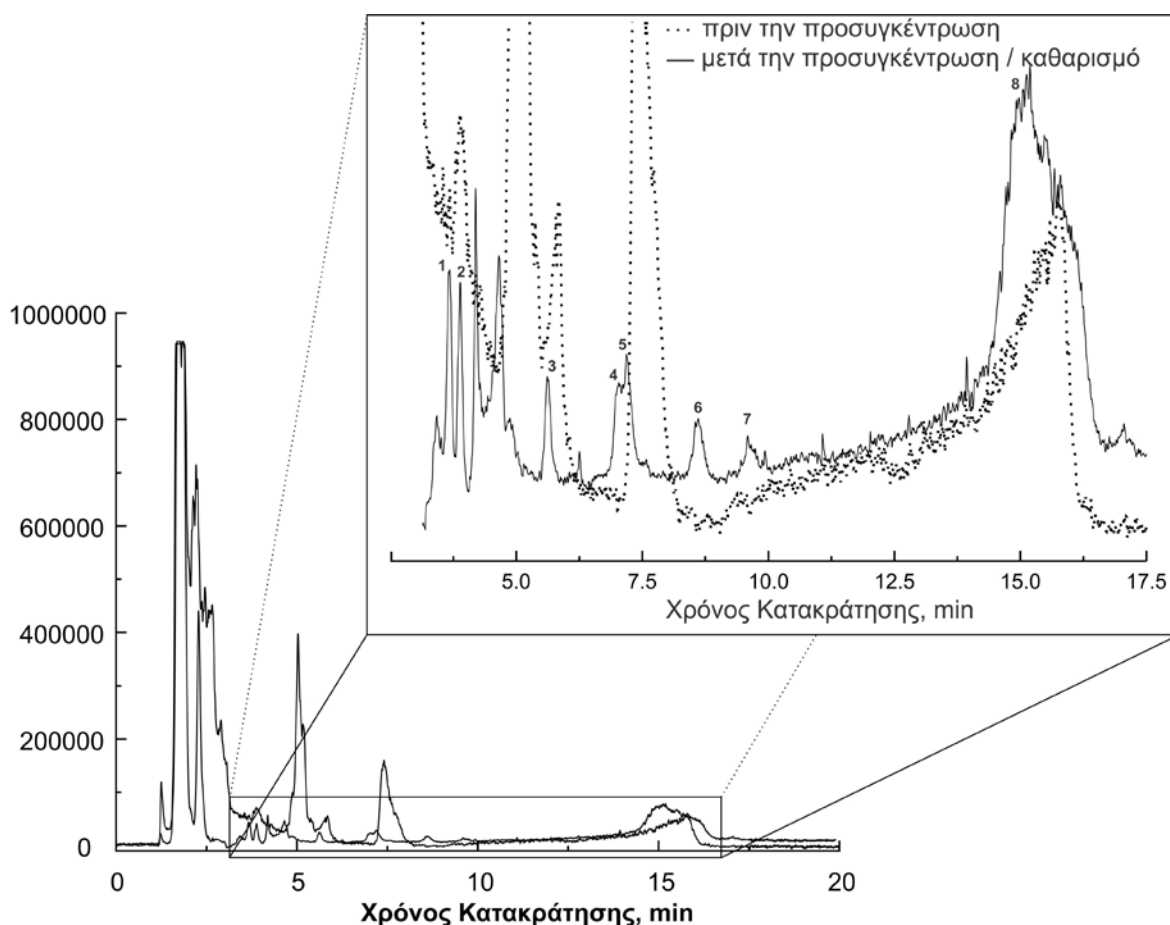


Σχήμα 3.3.2: Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων-X, XRD του υλικού $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$.

3.3.2 Καθαρισμός δείγματος και προσυγκέντρωση των σακχάρων

Η μελέτη της προσυγκέντρωσης των σακχάρων στο μαγνητικό υλικό $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ έγινε με πρότυπα διαλύματα σε δύο ακραίες αναλογίες $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$, δηλαδή 95/5 $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ (v/v), 100% H_2O (v/v) και μία ενδιάμεση, δηλαδή 50/50 $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$. Τα τρία επίπεδα ερευνώνται σε τρεις τιμές pH 3,0, 7,0 και 9,0. Πιο όξινο pH δεν είναι εφικτό λόγω της απόπλυσης του σιδήρου από το ενδεχομένως απροστάτευτο τμήμα του οξειδίου του σιδήρου, ενώ πιο βασικό pH δεν ενδείκνυται προκειμένου να αποφευχθεί η ταχεία διάλυση του SiO_2 . Η υψηλότερη προσρόφηση των σακχάρων επιτυγχάνεται σε αναλογία διαλυτών 95/5 $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ (v/v) για τις τιμές pH 7,0 και 9,0. Σε αναλογία διαλυτών 50/50 $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ (v/v), η μεγαλύτερη προσροφητική ικανότητα διαπιστώνεται στο αλκαλικό δείγμα σε σύγκριση με τα άλλα δύο, αν και η απόδοση του υλικού είναι μειωμένη σε αλκαλικό pH. Όσον αφορά στο 100% υδατικό πρότυπο διάλυμα των σακχάρων, η προσρόφηση επί του υλικού είναι μη ανιχνεύσιμη. Αυτό οφείλεται στην υψηλή υδροφιλικότητά τους και τη μειωμένη χημική τους συγγένεια με την τιτανία υπό αυτές τις συνθήκες.

Αντιθέτως, η εκρόφηση των σακχάρων από το υλικό είναι αποδοτικότερη όταν η υδατική φάση είναι σε περίσσεια σε σχέση με την οργανική. Ως εκ τούτου, για την εκρόφηση των σακχάρων από το υλικό χρησιμοποιείται μια ποσότητα 150 μL υδατικού διαλύματος μυρμηκικού οξέος σε pH 3,0. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η διαδικασία παγίδευσης των σακχάρων στη μαγνητική τιτανία, όχι μόνο προσυγκεντρώνει τα σάκχαρα αλλά ταυτόχρονα καθαρίζει τα δείγματα αερολύματος από παρεμποδίζουσες ενώσεις που εμφανίζονται κυρίως στην αρχή του χρωματογραφήματος. Αυτό επιβεβαιώνεται από το Σχήμα 3.3.2, στο οποίο απεικονίζονται δύο χρωματογραφήματα ενός πραγματικού δείγματος πριν και μετά την προσυγκέντρωση των σακχάρων στο υλικό της μαγνητικής τιτανίας.



Σχήμα 3.3.2: Χρωματογραφικό προφίλ πριν (διακεκομμένη γραμμή) και μετά (σταθερή γραμμή) από την προσυγκέντρωση/καθαρισμό του δείγματος αερολύματος. Χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο σχήμα 3.1.1.1.

Χρωματογραφικές κορυφές: 1) μαννοζάνη, 2) λεβογλυκοζάνη, 3) ερυθριτόλη, 4) ξυλιτόλη, 5) α-ραβιτόλη, 6) μαννόζη, 7) μαννιτόλη, 8) ινοσιτόλη

3.3.3 Πειράματα ανάκτησης και ανάλυση πραγματικού δείγματος

Η ακρίβεια της μεθόδου μελετάται με την ανάλυση εμβολιασμένου δείγματος σακχάρων συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g/mL}$. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται πρότυπα διαλύματα σακχάρων, συγκέντρωσης 1000 $\mu\text{g/mL}$. Στην αρχή της διαδικασίας τα φίλτρα κατεργάζονται στους 500 $^{\circ}\text{C}$ για τέσσερις ώρες και φυλάσσονται σε επίσης ψημένα φύλλα αλουμινίου μέχρι τη δειγματοληψία ή τον εμβολιασμό. Κατόπιν γίνεται ο εμβολιασμός στο φίλτρο με τα εννέα πρότυπα σάκχαρα, το καθένα σε συγκέντρωση 10 $\mu\text{g/mL}$. Εν συνεχεία, το φίλτρο εκχυλίζεται εις τριπλούν σε 3,6 mL διαλύματος 95/5 $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ (v/v), προσυγκεντρώνεται σε 150 μL υδατικού διαλύματος μυρμηκικού οξέος (pH 3,0) και αναλύεται. Το εμβολιασμένο δείγμα αναλύεται τρεις φορές σύμφωνα με την προτεινόμενη μέθοδο, ακο-

λουθώντας την πειραματική πορεία που περιγράφεται παραπάνω. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων για κάθε ένωση παρατίθενται στον Πίνακα 3.3.3. Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 3.3.3, οι ανακτήσεις των σακχάρων που μελετούνται κυμαίνονται από 97% έως 105% και κρίνονται ιδιαίτερα ικανοποιητικές.

Μετά τη δειγματοληψία και την προσυγκέντρωση στο φίλτρο υάλου 5 m³ δείγματος αερολύματος από το κέντρο της πόλης των Ιωαννίνων (Ελλάδα), το δείγμα εκχυλίζεται, προσυγκεντρώνεται/καθαρίζεται και αναλύεται ενώ ταυτόχρονα συγκρίνεται με ένα δείγμα τυφλού. Ακολούθως διαπιστώνεται ότι ανιχνεύονται τα περισσότερα από τα παραπάνω σάκχαρα σε συγκεντρώσεις από 83 ng/m³ για την μαννιτόλη έως 200 ng/m³ για τη μαννοζάνη και λεβογλυκοζάνη.

Η προσυγκέντρωση των σακχάρων σε μαγνητικά σωματίδια τιτανίας επιτρέπει την ποσοτικοποίησή τους σε δείγματα αερολύματος, με αποτέλεσμα τα LOD και LOQ να μειώνονται κατά 24 φορές (από 3,6 mL σε 0,15 mL). Παράλληλα, στο Σχήμα 3.3.2 (διακεκομμένη γραμμή) απεικονίζεται το χρωματογράφημα του μη επεξεργασμένου δείγματος, στο οποίο είναι ορατή η παρουσία των αλληλεπικαλυπτόμενων κορυφών που παρεμποδίζουν την ανάλυση. Οι συγκεντρώσεις που ανιχνεύονται είναι συγκρίσιμες ή χαμηλότερες από αυτές που ανιχνεύονται σε δείγματα αερολύματος σε αστικές και αγροτικές περιοχές [Caseiro, *et al.*, 2007, Ma, *et al.*, 2009].

Πίνακας 3.3.3: Ανακτήσεις των σακχάρων.

Ένωση	Ανάκτηση	
	Εμβολιασμός (μg/mL)	Ανάκτηση (%)*
Μαννοζάνη	10,0	98,8
Λεβογλυκοζάνη	10,0	99,7
Ερυθριτόλη	10,0	99,6
Ξυλιτόλη	10,0	100,0
Αραβιτόλη	10,0	105,5
Μαννόζη	10,0	98,8
Μαννιτόλη	10,0	98,6
Ινοσιτόλη	10,0	101,3
Σακχαρόζη	10,0	96,8

* 0,8 < % RSD < 2,0

3.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη, προτείνεται μια μέθοδος προσδιορισμού σακχάρων σε δείγματα αερολύματος με υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης και ανιχνευτή σκεδασμού φωτός (HILIC/ELSD). Τα σάκχαρα είναι αρκετά υδρόφιλα, μη πτητικά μόρια, δεν απορροφούν στο ορατό και υπεριώδες και λόγω της πολικής τους φύσης είναι δύσκολο να αναλυθούν με μια μέθοδο η οποία δεν απαιτεί εξελιγμένα και ακριβά αναλυτικά όργανα, οργανικούς διαλύτες, επίπονη επεξεργασία του δείγματος ή παραγωγοποίηση.

Από την άλλη μεριά, η HILIC προϋποθέτει υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις παρουσία μίγματος υδατο-οργανικών κινητών φάσεων για την δημιουργία μιας στιβάδας ύδατος στην επιφάνεια της στατικής φάσης μέσα στην οποία οι αναλύτες κατανέμονται με βάση την πολικότητά τους. Ο μηχανισμός αυτός είναι πολύ αποτελεσματικός για την κατακράτηση ισχυρά πολικών ενώσεων και κατά συνέπεια και των σακχάρων. Έτσι, η HILIC σε συνδυασμό με ανιχνευτή ELSD, ο οποίος είναι κατάλληλος για την ανίχνευση μη πτητικών ενώσεων που δεν απορροφούν, αποτελεί μία λογική προσέγγιση.

Τα σάκχαρα τα οποία μελετώνται, παρουσιάζουν τυπική συμπεριφορά υδρόφιλης αλληλεπίδρασης με τη στήλη της διόλης-πυριτίας, υπό τις βέλτιστες συνθήκες, παρουσιάζοντας ικανοποιητικό διαχωρισμό. Η επίτευξη ενός ικανοποιητικού διαχωρισμού στην HILIC περιλαμβάνει έναν συμβιβασμό μεταξύ της χρωματογραφικής απόδοσης της στήλης (k' , T_f , R_s , N) και του συνολικού χρόνου ανάλυσης. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των σακχάρων επιλέγεται κινητή φάση αποτελούμενη από: HCOOH 10 mM, pH 3,0 και σε αναλογία διαλυτών 90/10 ACN/ H_2O (v/v). Επιπλέον, η βέλτιστη θερμοκρασία της στήλης είναι 30 °C, η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης 0,8 mL/min και η θερμοκρασία εξάτμισης της κινητής φάσης 40 °C, σε ευαισθησία (gain) 12.

Λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεων των σακχάρων στα ατμοσφαιρικά δείγματα, ο ανιχνευτής ELSD από μόνος του δεν είναι ικανός για την ανίχνευσή τους. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητη η προσυγκέντρωσή τους. Η τιτανία παρουσιάζει χημική συγγένεια με τα σάκχαρα με αποτέλεσμα να μπορεί σε κατάλληλες συνθήκες να τα προσυγκεντρώνει. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η τιτανία εξυπηρετεί με διπλό τρόπο την ανάλυση αφού χρησιμοποιείται τόσο για προσυγκέντρωση όσο και για τον ταυτόχρονο καθαρισμό του δείγματος. Για λόγους εύκολης συλλογής του προσροφητικού υλικού, η τιτανία συντέθηκε στην επιφάνεια μαγνητικών σωματιδίων. Η προσρόφηση των σακχάρων στο υλικό αυξάνεται με την αύξηση της περιεκτικότητας του ACN στο εκχύλισμα. Αντιθέτως, η εκρόφησή τους γίνεται σε υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος σε pH 3,0. Με την απλή αυτή διαδικασία επιτυγχάνεται η προσυγκέντρωση στα μαγνητικά σωματίδια τιτανίας και ταυτόχρονα ο καθα-

ρισμός τους, ενώ επιτρέπεται και η ποσοτικοποίηση των σακχάρων σε δείγματα αερολύματος.

Η συνολική προσέγγιση του διαχωρισμού των σακχάρων με HILIC και ανιχνευτή ELSD σε συνδυασμό με την προσυγκέντρωσή τους επάνω σε μαγνητικά υλικά καθιστά την προτεινόμενη αναλυτική μέθοδο ιδιαίτερα αποτελεσματική.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abidi, S., Kim, I. and Rennick, K.**, Determination of nonvolatile components of heated soybean oils separated with high-efficiency mixed-bed polystyrene/divinylbenzene columns, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1999**, 76, 939-944.
- Abidi, S.L. and Mounts, T.L.**, Reversed-phase separations of nitrogenous phospholipids on an octadecanoyl poly(vinyl alcohol) phase, *J. Chromatogr. A*, **1997**, 773, 93-101.
- Abraham, M.H. and Platts, J.A.**, Hydrogen Bond Structural Group Constants, *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 3484-3491.
- Ali, M.S., Ghor, M., Rafiuddin, S. and Khatri, A.R.**, A new hydrophilic interaction liquid chromatographic (HILIC) procedure for the simultaneous determination of pseudoephedrine hydrochloride (PSH), diphenhydramine hydrochloride (DPH) and dextromethorphan hydrobromide (DXH) in cough-cold formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2007**, 43, 158-167.
- Alpert, A.J.**, Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, *J. Chromatogr. A*, **1990**, 499, 177-196.
- Alpert, A.J.**, Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography for Isocratic Separation of Charged Solutes and Selective Isolation of Phosphopeptides, *Anal. Chem.*, **2007**, 80, 62-76.
- Alpert, A.J., Shukla, M., Shukla, A.K., Zieske, L.R., Yuen, S.W., Ferguson, M.A.J., Mehlert, A., Pauly, M. and Orlando, R.**, Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates, *J. Chromatogr. A*, **1994**, 676, 191-202.
- Appelblad, P., Jonsson, T., Jiang, W. and Irgum, K.**, Fast hydrophilic interaction liquid chromatographic separations on bonded zwitterionic stationary phase, *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 1529-1536.
- Asmus, P. and Landis, J.**, Analysis of steroids in bulk pharmaceuticals by liquid chromatography with light-scattering detection, *J. Chromatogr. A*, **1984**, 316, 461-472.
- Bari, M.A., Baumbach, G., Kuch, B. and Scheffknecht, G.**, Temporal variation and impact of wood smoke pollution on a residential area in southern Germany, *Atmos. Environ.*, **2010**, 44, 3823-3832.
- Bauer, H., Claeys, M., Vermeylen, R., Schueller, E., Weinke, G., Berger, A. and Puxbaum, H.**, Arabitol and mannitol as tracers for the quantification of airborne fungal spores, *Atmos. Environ.*, **2008**, 42, 588-593.
- Berthod, A., Chang, S.S.C., Kullman, J.P.S. and Armstrong, D.W.**, Practice and mechanism of HPLC oligosaccharide separation with a cyclodextrin bonded phase, *Talanta*, **1998**, 47, 1001-1012.
- Bianchi, F., Chiesi, V., Casoli, F., Luches, P., Nasi, L., Careri, M. and Mangia, A.**, Magnetic solid-phase extraction based on diphenyl functionalization of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine samples, *J. Chromatogr. A*, **2012**, 1231, 8-15.
- Boersema, P., Mohammed, S. and Heck, A.**, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 391, 151-159.
- Breinhold, P., Mosca, L. and Lindner, W.**, Concept of sequential analysis of free and conjugated phytosterols in different plant matrices, *J. Chromatogr. B*, **2002**, 777, 67-82.
- Caseiro, A., Marr, I.L., Claeys, M., Kasper-Giebl, A., Puxbaum, H. and Pio, C.A.**, Determination of saccharides in atmospheric aerosol using anion-exchange high-performance liquid chromatography and pulsed-amperometric detection, *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1171, 37-45.
- Cataldi, T.R.I., Campa, C. and De Benedetto, G.E.**, Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: The potential is still growing, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2000**, 368, 739-758.

Chaimbault, P., Petritis, K., Elfakir, C. and Dreux, M., Determination of 20 underivatized proteinic amino acids by ion-pairing chromatography and pneumatically assisted electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 855, 191-202.

Chan, M.N., Choi, M.Y., Ng, N.L. and Chan, C.K., Hygroscopicity of Water-Soluble Organic Compounds in Atmospheric Aerosols: Amino Acids and Biomass Burning Derived Organic Species, *Environ. Sci. Technol.*, **2005**, 39, 1555-1562.

Chase, G.W., Akoh, C.C., Eitenmiller, R.R. and Landen, W.O., Liquid Chromatographic Method for the Concurrent Analysis of Sucrose Polyester, Vitamin A Palmitate, and β -Carotene in Margarine, *J. Liq. Chromatogr.*, **1995**, 18, 3129-3138.

Chen, C.-T. and Chen, Y.-C., Fe₃O₄/TiO₂ Core/Shell Nanoparticles as Affinity Probes for the Analysis of Phosphopeptides Using TiO₂ Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 5912-5919.

Christopherson, M.J., Yoder, K.J. and Hill, J.T., Hydrophilic Interaction Liquid Chromatographic (HILIC)/Ion Exchange Separation of Picolinic and Nicotinic Acids, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2006**, 29, 2545-2558.

Churms, S.C., Recent developments in the chromatographic analysis of carbohydrates, *J. Chromatogr. A*, **1990**, 500, 555-583.

Churms, S.C., Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 720, 75-91.

Clement, A., Yong, D. and Brechet, C., Simultaneous Identification of Sugars by HPLC Using Evaporative Light Scattering Detection (ELSD) and Refractive Index Detection (RI). Application to Plant Tissues, *J. Liq. Chromatogr.*, **1992**, 15, 805-817.

Criado, A., Cárdenas, S., Gallego, M. and Valcárcel, M., Usefulness of the evaporative light scattering detector for direct screening of biological fluids, *Anal. Chim. Acta.*, **2001**, 435, 281-288.

Dinh, N.P., Jonsson, T. and Irgum, K., Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218, 5880-5891.

Dixon, R.W. and Baltzell, G., Determination of levoglucosan in atmospheric aerosols using high performance liquid chromatography with aerosol charge detection, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1109, 214-221.

Dye, C. and Yttri, K.E., Determination of Monosaccharide Anhydrides in Atmospheric Aerosols by Use of High-Performance Liquid Chromatography Combined with High-Resolution Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 1853-1858.

Fabbri, D., Torri, C., Simoneit, B.R.T., Marynowski, L., Rushdi, A.I. and Fabiańska, M.J., Levoglucosan and other cellulose and lignin markers in emissions from burning of Miocene lignites, *Atmos. Environ.*, **2009**, 43, 2286-2295.

Friedman, M., Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1054, 143-155.

Gika, H., Theodoridis, G., Mattivi, F., Vrhovsek, U. and Pappa-Louisi, A., Retention prediction of a set of amino acids under gradient elution conditions in hydrophilic interaction liquid chromatography, *J. Sep. Sci.*, **2012**, 35, 376-383.

Guenu, S., Seigneuret, J.M. and Dreux, M., ANALYSIS OF MALTODEXTRINS IN PLANT EXTRACTS BY LC USING EVAPORATIVE LIGHT SCATTERING DETECTION, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2000**, 23, 2883-2896.

Guiochon, G., Moysan, A. and Holley, C., Influence of Various Parameters on the Response Factors of the Evaporative Light Scattering Detector for a Number of Non-Volatile Compounds, *J. Liq. Chromatogr.*, **1988**, 11, 2547-2570.

Guo, Y., Analysis of Quaternary Amine Compounds by Hydrophilic Interaction Chromatography/Mass Spectrometry (HILIC/MS), *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2005**, 28, 497-512.

Guo, Y. and Gaiki, S., Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1074, 71-80.

Guo, Y. and Huang, A., A HILIC method for the analysis of tromethamine as the counter ion in an investigational pharmaceutical salt, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, 31, 1191-1201.

Hao, Z., Lu, C.-Y., Xiao, B., Weng, N., Parker, B., Knapp, M. and Ho, C.-T., Separation of amino acids, peptides and corresponding Amadori compounds on a silica column at elevated temperature, *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1147, 165-171.

Havlicek, J. and Samuelson, O., Separation of oligosaccharides by partition chromatography on ion exchange resins, *Anal. Chem.*, **1975**, 47, 1854-1857.

Hemström, P. and Irgum, K., Hydrophilic interaction chromatography, *J. Sep. Sci.*, **2006**, 29, 1784-1821.

Herbreteau, B., Lafosse, M., Morin-Allory, L. and Dreux, M., Automatic sugar analysis in the beet industry. Part I: Parameter optimization of a reversed phase HPLC carbohydrate determination, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1990**, 13, 239-243.

Jandera, P., Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts, *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 1421-1437.

Jandera, P., Hájek, T., Škeříková, V. and Soukup, J., Dual hydrophilic interaction-RP retention mechanism on polar columns: Structural correlations and implementation for 2-D separations on a single column, *J. Sep. Sci.*, **2010**, 33, 841-852.

Jia, Y., Bhat, S. and Fraser, M.P., Characterization of saccharides and other organic compounds in fine particles and the use of saccharides to track primary biologically derived carbon sources, *Atmos. Environ.*, **2010a**, 44, 724-732.

Jia, Y., Clements, A.L. and Fraser, M.P., Saccharide composition in atmospheric particulate matter in the southwest US and estimates of source contributions, *J. Aerosol Sci.*, **2010b**, 41, 62-73.

Jia, Y. and Fraser, M., Characterization of saccharides in size-fractionated ambient particulate matter and aerosol sources: The contribution of primary biological aerosol particles (PBAPs) and soil to ambient particulate matter, *Environ. Sci. Technol.*, **2011**, 45, 930-936.

Jin, G., Guo, Z., Zhang, F., Xue, X., Jin, Y. and Liang, X., Study on the retention equation in hydrophilic interaction liquid chromatography, *Talanta*, **2008**, 76, 522-527.

Jönsson, J.Å. and Mathiasson, L., Membrane extraction in analytical chemistry, *J. Sep. Sci.*, **2001**, 24, 495-507.

Karatapanis, A., Fiamegos, Y. and Stalikas, C., Study of the Behavior of Water-Soluble Vitamins in HILIC on a Diol Column, *Chromatographia*, **2010**, 71, 751-759.

Karatapanis, A.E., Fiamegos, Y. and Stalikas, C.D., Silica-modified magnetic nanoparticles functionalized with cetylpyridinium bromide for the preconcentration of metals after complexation with 8-hydroxyquinoline, *Talanta*, **2011a**, 84, 834-839.

Karatapanis, A.E., Fiamegos, Y.C., Sakkas, V.A. and Stalikas, C.D., Effect of chromatographic parameters and detector settings on the response of HILIC–evaporative light-scattering detection system using experimental design approach and multicriteria optimization methodology, *Talanta*, **2011b**, 83, 1126-1133.

Karatapanis, A.E., Fiamegos, Y.C. and Stalikas, C.D., A revisit to the retention mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography using model organic compounds, *J. Chromatogr. A*, **2011c**, 1218, 2871-2879.

Kawachi, Y., Ikegami, T., Takubo, H., Ikegami, Y., Miyamoto, M. and Tanaka, N., Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency, *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218, 5903-5919.

Kotani, Y., Matsuda, A., Kogure, T., Tatsumisago, M. and Minami, T., Effects of Addition of Poly(ethylene glycol) on the Formation of Anatase Nanocrystals in SiO₂-TiO₂ Gel Films with Hot Water Treatment, *Chem. Mater.*, **2001**, 13, 2144-2149.

- Kovalova, L., McArdell, C.S. and Hollender, J.**, Challenge of high polarity and low concentrations in analysis of cytostatics and metabolites in wastewater by hydrophilic interaction chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216, 1100-1108.
- Kwon, S.W., Han, S.B., Park, I.H., Kim, J.M., Park, M.K. and Park, J.H.**, Liquid chromatographic determination of less polar ginsenosides in processed ginseng, *J. Chromatogr. A*, **2001**, 921, 335-339.
- Lampert, B.M. and Stewart, J.T.**, Determination of cocaine and selected metabolites in canine and human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography on coupled cyanopropyl and silica columns, *J. Chromat. B: Biomed. Sci. Appl.*, **1989**, 495, 153-165.
- Letter, W.S.**, A Qualitative Method for Triglyceride Analysis by HPLC Using an Evaporative Light-Scattering Detector, *J. Liq. Chromatogr.*, **1993**, 16, 225-239.
- Li, R. and Huang, J.**, Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1041, 163-169.
- Li, W. and Fitzloff, J.F.**, Determination of 24(R)-pseudoginsenoside F11 in North American ginseng using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2001**, 25, 257-265.
- Lin, X., Wang, J., Li, L., Wang, X., Lü, H. and Xie, Z.**, Separation and determination of five major opium alkaloids with mixed mode of hydrophilic/cation-exchange monolith by pressurized capillary electrochromatography, *J. Sep. Sci.*, **2007**, 30, 3011-3017.
- Linden, J.C. and Lawhead, C.L.**, Liquid chromatography of saccharides, *J. Chromatogr. A*, **1975**, 105, 125-133.
- Liu, M., Ostovic, J., Chen, E.X. and Cauchon, N.**, Hydrophilic interaction liquid chromatography with alcohol as a weak eluent, *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216, 2362-2370.
- Lü, Z., Zhang, P. and Jia, L.**, Preparation of chitosan functionalized monolithic silica column for hydrophilic interaction liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217, 4958-4964.
- Ma, S., Wang, Z., Bi, X., Sheng, G. and Fu, J.**, Composition and source of saccharides in aerosols in Guangzhou, China, *Chin. Sci. Bull.*, **2009**, 54, 4500-4506.
- Martínez Montero, C., Rodríguez Doderó, M.C., Guillén Sánchez, D.A. and Barroso, C.G.**, Analysis of Low Molecular Weight Carbohydrates in Food and Beverages: A Review, *Chromatographia*, **2004**, 59, 15-30.
- McCalley, D.V.**, Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds?, *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1171, 46-55.
- McCalley, D.V.**, The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: Some possible approaches for improved separations, *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217, 858-880.
- McCalley, D.V. and Neue, U.D.**, Estimation of the extent of the water-rich layer associated with the silica surface in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1192, 225-229.
- Medeiros, P.M., Conte, M.H., Weber, J.C. and Simoneit, B.R.T.**, Sugars as source indicators of biogenic organic carbon in aerosols collected above the Howland Experimental Forest, Maine, *Atmos. Environ.*, **2006**, 40, 1694-1705.
- Megoulas, N.C. and Koupparis, M.A.**, Twenty Years of Evaporative Light Scattering Detection, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **2005**, 35, 301-316.
- Modig, K., Pfrommer, B.G. and Halle, B.**, Temperature-Dependent Hydrogen-Bond Geometry in Liquid Water, *Phys. Rev. Lett.*, **2003**, 90, 075502.
- Nguyen, H.P. and Schug, K.A.**, The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications, *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 1465-1480.

Niemi, J.V., Saarikoski, S., Aurela, M., Tervahattu, H., Hillamo, R., Westphal, D.L., Aarnio, P., Koskentalo, T., Makkonen, U., Vehkamäki, H. and Kulmala, M., Long-range transport episodes of fine particles in southern Finland during 1999–2007, *Atmos. Environ.*, **2009**, 43, 1255-1264.

Nikitas, P., Pappa-Louisi, A. and Agrafiotou, P., Effect of the organic modifier concentration on the retention in reversed-phase liquid chromatography: II. Tests using various simplified models, *J. Chromatogr. A*, **2002**, 946, 33-45.

Nikolov, Z.L. and Reilly, P.J., Retention of carbohydrates on silica and amine-bonded silica stationary phases: application of the hydration model, *J. Chromatogr. A*, **1985**, 325, 287-293.

Niwa, T., Maruyama, W., Nakahara, D., Takeda, N., Yoshizumi, H., Tatematsu, A., Takahashi, A., Dostert, P., Naoi, M. and Nagatsu, T., Endogenous synthesis of N-methylsalsolinol, an analogue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, in rat brain during in vivo microdialysis with salsolinol, as demonstrated by gas chromatography—mass spectrometry, *J. Chromat. B: Biomed. Sci. Appl.*, **1992**, 578, 109-115.

Nolte, C.G., Schauer, J.J., Cass, G.R. and Simoneit, B.R.T., Highly Polar Organic Compounds Present in Wood Smoke and in the Ambient Atmosphere, *Environ. Sci. Technol.*, **2001**, 35, 1912-1919.

Novotny, M.V. and Mechref, Y., New hyphenated methodologies in high-sensitivity glycoprotein analysis, *J. Sep. Sci.*, **2005**, 28, 1956-1968.

Olsen, B.A., Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities, *J. Chromatogr. A*, **2001**, 913, 113-122.

Oppenheimer, L.E. and Mourey, T.H., Examination of the concentration response of evaporative light-scattering mass detectors, *J. Chromatogr. A*, **1985**, 323, 297-304.

Orentienė, A., Olšauskaitė, V., Vičkačkaitė, V. and Padarauskas, A., Retention behaviour of imidazolium ionic liquid cations on 1.7 μm ethylene bridged hybrid silica column using acetonitrile-rich and water-rich mobile phases, *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218, 6884-6891.

Orth, P. and Engelhardt, H., Trennung von Zuckern an chemisch modifizierten Kieselgelen, *Chromatographia*, **1982**, 15, 91-96.

Pack, B.W. and Risley, D.S., Evaluation of a monolithic silica column operated in the hydrophilic interaction chromatography mode with evaporative light scattering detection for the separation and detection of counter-ions, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1073, 269-275.

Palmer, J.K., A Versatile System for Sugar Analysis via Liquid Chromatography, *Anal. Lett.*, **1975**, 8, 215-224.

Phillippy, B.Q., Bland, J.M. and Evens, T.J., Ion Chromatography of Phytate in Roots and Tubers, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 51, 350-353.

Pio, C.A., Legrand, M., Alves, C.A., Oliveira, T., Afonso, J., Caseiro, A., Puxbaum, H., Sanchez-Ochoa, A. and Gelencsér, A., Chemical composition of atmospheric aerosols during the 2003 summer intense forest fire period, *Atmos. Environ.*, **2008**, 42, 7530-7543.

Poole, C.F., The essence of chromatography *Elsevier, Amsterdam*, **2003**, p. 19-23, 349-359.

Porter, R.S. and Chen, T.K., High-performance liquid chromatographic analysis of mupirocin in polyethylene glycols 400 and 3350 using dual ultraviolet and evaporative light scattering detection, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 732, 399-402.

Quiming, N., Denola, N., Saito, Y., Catabay, A. and Jinno, K., Chromatographic Behavior of Uric Acid and Methyl Uric Acids on a Diol Column in HILIC, *Chromatographia*, **2008**, 67, 507-515.

Quiming, N.S., Denola, N.L., Ueta, I., Saito, Y., Tatematsu, S. and Jinno, K., Retention prediction of adrenoceptor agonists and antagonists on a diol column in hydrophilic interaction chromatography, *Anal. Chim. Acta.*, **2007**, 598, 41-50.

Rabel, F.M., Caputo, A.G. and Butts, E.T., Separation of carbohydrates on a new polar bonded phase material, *J. Chromatogr. A*, **1976**, 126, 731-740.

Righezza, M. and Guiochon, G., Effects of the Nature of the Solvent and Solutes on the Response of a Light-Scattering Detector, *J. Liq. Chromatogr.*, **1988**, 11, 1967-2004.

Risley, D.S. and Peterson, J.A., A High-Performance Liquid Chromatography Method for the Quantitation of Impurities in an NMDA Antagonist Using Evaporative Light Scattering Detection, *J. Liq. Chromatogr.*, **1995**, 18, 3035-3048.

Rocklin, R.D. and Pohl, C.A., Determination of Carbohydrates by Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection, *J. Liq. Chromatogr.*, **1983**, 6, 1577-1590.

Sanz, M.L. and Martínez-Castro, I., Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates, *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1153, 74-89.

Schkolnik, G., Falkovich, A.H., Rudich, Y., Maenhaut, W. and Artaxo, P., New Analytical Method for the Determination of Levoglucosan, Polyhydroxy Compounds, and 2-Methylerythritol and Its Application to Smoke and Rainwater Samples, *Environ. Sci. Technol.*, **2005**, 39, 2744-2752.

Schkolnik, G. and Rudich, Y., Detection and quantification of levoglucosan in atmospheric aerosols: a review, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**, 385, 26-33.

Scott, P.R.W., The Thermodynamics of Chromatography, *Chrom-Ed Book Series, LIBRARY4SCIENCE, LLC*, **2003**, pp. 1-12.

Shou, W.Z. and Naidong, W., Simple means to alleviate sensitivity loss by trifluoroacetic acid (TFA) mobile phases in the hydrophilic interaction chromatography–electrospray tandem mass spectrometric (HILIC–ESI/MS/MS) bioanalysis of basic compounds, *J. Chromatogr. B*, **2005**, 825, 186-192.

Simoneit, B.R.T., Biomass burning — a review of organic tracers for smoke from incomplete combustion, *Appl. Geochem.*, **2002**, 17, 129-162.

Simoneit, B.R.T. and Elias, V.O., Organic tracers from biomass burning in atmospheric particulate matter over the ocean, *Mar. Chem.*, **2000**, 69, 301-312.

Simoneit, B.R.T., Schauer, J.J., Nolte, C.G., Oros, D.R., Elias, V.O., Fraser, M.P., Rogge, W.F. and Cass, G.R., Levoglucosan, a tracer for cellulose in biomass burning and atmospheric particles, *Atmos. Environ.*, **1999**, 33, 173-182.

Snyder, L.R. and Poppe, H., Mechanism of solute retention in liquid–solid chromatography and the role of the mobile phase in affecting separation : Competition versus “sorption”, *J. Chromatogr. A*, **1980**, 184, 363-413.

Soczewinski, E., Solvent composition effects in thin-layer chromatography systems of the type silica gel-electron donor solvent, *Anal. Chem.*, **1969**, 41, 179-182.

Soczewiński, E. and Wachtmeister, C.A., The relation between the composition of certain ternary two-phase solvent systems and RM values, *J. Chromatogr. A*, **1962**, 7, 311-320.

Stolyhwo, A., Martin, M. and Guiochon, G., Analysis of Lipid Classes by HPLC with the Evaporative Light Scattering Detector, *J. Liq. Chromatogr.*, **1987**, 10, 1237-1253.

Strege, M.A., Hydrophilic Interaction Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry Analysis of Polar Compounds for Natural Product Drug Discovery, *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 2439-2445.

Takeuchi, T. and Lim, L.W., Multifunctional Separation Mechanism on Poly(oxyethylene) Stationary Phases in Capillary Liquid Chromatography, *Anal. Sci.*, **2010**, 26, 937-941.

Tanaka, H., Zhou, X. and Masayoshi, O., Characterization of a novel diol column for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 987, 119-125.

Tani, K., Kitada, M., Tachibana, M., Koizumi, H. and Kiba, T., Retention behavior of monosaccharides and disaccharides on titania, *Chromatographia*, **2003**, 57, 409-412.

Tolstikov, V.V. and Fiehn, O., Analysis of Highly Polar Compounds of Plant Origin: Combination of Hydrophilic Interaction Chromatography and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry, *Anal. Biochem.*, **2002**, 301, 298-307.

van Beek, T.A., Chemical analysis of Ginkgo biloba leaves and extracts, *J. Chromatogr. A*, **2002**, 967, 21-55.

Verhaar, L.A.T. and Kuster, B.F.M., Contribution to the elucidation of the mechanism of sugar retention on amine-modified silica in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **1982**, 234, 57-64.

Verzele, M., Simoens, G. and Van Damme, F., A critical review of some liquid chromatography systems for the separation of sugars, *Chromatographia*, **1987**, 23, 292-300.

Vikingsson, S., Kronstrand, R. and Josefsson, M., Retention of opioids and their glucuronides on a combined zwitterion and hydrophilic interaction stationary phase, *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1187, 46-52.

Vynios, D.H., Karamanos, N.K. and Tsiganos, C.P., Advances in analysis of glycosaminoglycans: its application for the assessment of physiological and pathological states of connective tissues, *J. Chromatogr. B*, **2002**, 781, 21-38.

Wan, E.C.H. and Yu, J.Z., Determination of sugar compounds in atmospheric aerosols by liquid chromatography combined with positive electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1107, 175-181.

Wang, Q. and Fang, Y., Analysis of sugars in traditional Chinese drugs, *J. Chromatogr. B*, **2004**, 812, 309-324.

Wang, X., Li, W. and Rasmussen, H.T., Orthogonal method development using hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography for the determination of pharmaceuticals and impurities, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1083, 58-62.

Wei, Y. and Ding, M.-Y., Analysis of carbohydrates in drinks by high-performance liquid chromatography with a dynamically modified amino column and evaporative light scattering detection, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 904, 113-117.

Wei, Y. and Ding, M.-Y., ETHANOLAMINE AS MODIFIER FOR ANALYSIS OF CARBOHYDRATES IN FOODS BY HPLC AND EVAPORATIVE LIGHT SCATTERING DETECTION, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2002**, 25, 1769-1778.

Whelan, M.R., Ford, J.L. and Powell, M.W., Simultaneous determination of ibuprofen and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) using HPLC and evaporative light scattering detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2002**, 30, 1355-1359.

Wu, J., Bicker, W. and Lindner, W., Separation properties of novel and commercial polar stationary phases in hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography mode, *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 1492-1503.

Wuhrer, M., Deelder, A.M. and Hokke, C.H., Protein glycosylation analysis by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **2005**, 825, 124-133.

Xu, L., Shi, H., Liang, T., Feng, J., Jin, Y., Ke, Y. and Liang, X., Selective separation of flavonoid glycosides in *Dalbergia odorifera* by matrix solid-phase dispersion using titania, *J. Sep. Sci.*, **2011**, 34, 1347-1354.

Xuan, Y., Scheuermann, E.B., Meda, A.R., Hayen, H., von Wirén, N. and Weber, G., Separation and identification of phytosiderophores and their metal complexes in plants by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1136, 73-81.

Zaia, J., Mass spectrometry of oligosaccharides, *Mass Spectrom. Rev.*, **2004**, 23, 161-227.

Zeng, Y.Y., Chen, H.-J., Shiao, K.J., Hung, S.-U., Wang, Y.-S. and Wu, C.-C., Efficient enrichment of phosphopeptides by magnetic TiO₂-coated carbon-encapsulated iron nanoparticles, *Proteomics*, **2012**, 12, 380-390.

Zhang, S., Niu, H., Hu, Z., Cai, Y. and Shi, Y., Preparation of carbon coated Fe₃O₄ nanoparticles and their application for solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water samples, *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217, 4757-4764.

Zhou, T. and Lucy, C.A., Hydrophilic interaction chromatography of nucleotides and their pathway intermediates on titania, *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1187, 87-93.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μελέτη της παρουσίας των αιωρούμενων σωματιδίων στην ατμόσφαιρα είναι μεγάλης σημασίας, καθώς η εκτίμηση των επιπτώσεών τους στον άνθρωπο και στο περιβάλλον είναι ένα εξαιρετικά πολύπλοκο ζήτημα για την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα.

Η μελέτη των αιωρούμενων σωματιδίων αποτέλεσε ερευνητικό αντικείμενο μόλις τις τελευταίες δεκαετίες και με βάση μελέτες που έγιναν, διαπιστώθηκε η επίπτωσή τους στην υγεία του ανθρώπου και την κλιματική αλλαγή. Επίσης, αποδεικνύεται ο ρόλος τους στις διεργασίες σχηματισμού των νεφών και της ομίχλης και στη διαμόρφωση του ενεργειακού ισοζυγίου του πλανήτη. Ωστόσο, τα αιωρούμενα σωματίδια δεν μπορούν να μελετηθούν εύκολα εξαιτίας της σύνθετης χημικής τους σύνθεσης. Για το λόγο αυτό η μελέτη εστιάζεται στα σάκχαρα, αφού έχει αποδειχθεί ότι τα σάκχαρα αποτελούν ιχνηθέτες των οργανικών πηγών του διοξειδίου του άνθρακα και της πορείας μεταφοράς του οργανικού άνθρακα στην ατμόσφαιρα.

Στην παρούσα μελέτη, αναπτύχθηκε μία απλή, γρήγορη και εύκολα εφαρμόσιμη μέθοδος για τον προσδιορισμό των σακχάρων σε δείγματα αερολύματος μέσω υγρής χρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης και ανιχνευτή σκεδασμού φωτός. Τοιούτοτρόπως, έγινε επιλογή της κατάλληλης στατικής φάσης και πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών ανάλυσης με σκοπό να επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός των σακχάρων σε σχετικά μικρό χρόνο κατακράτησης και καλή συμμετρία κορυφών για τα σάκχαρα. Έτσι, οι βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες ανάλυσης που επιλέχθηκαν ήταν: στατική φάση διόλη με βάση την πυριτία, σύσταση κινητής φάσης ACN/H₂O 90/10 (v/v) που περιείχε HCOOH 10 mM, με pH κινητής φάσης 3,0 και ταχύτητα ροής κινητής φάσης 0,8 mL/min. Οι συνθήκες του ανιχνευτή βελτιστοποιήθηκαν προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία ανίχνευσης των σακχάρων και για το σκοπό αυτό οι βέλτιστες συνθήκες που επιλέχθηκαν ήταν οι εξής: θερμοκρασία ανιχνευτή 40 °C, gain 12 και ταχύτητα ροής αερίου εκνέφωσης 3,4 L/min. Σύμφωνα λοιπόν με τις βελτιστοποιημένες αυτές χρωματογραφικές συνθήκες, παρατηρήθηκε ότι τα σάκχαρα παρουσιάζουν τυπική συμπεριφορά υδρόφιλης αλληλεπίδρασης με τη στατική φάση.

Επίσης, λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεων των σακχάρων στα ατμοσφαιρικά δείγματα έγινε προσυγκέντρωση των σακχάρων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν μαγνητικά υλικά τιτανίας, τα οποία εξυπηρετούν όχι μόνο στην προσυγκέντρωση αλλά και στον καθαρισμό του δείγματος, χάρη στη δυνατότητά τους να προσροφούν μόνο τα σάκχαρα, ενώ ταυτόχρονα απομακρύνονται εύκολα από το εκχύλισμα του δείγματος. Τα LOD και LOQ της μεθόδου κυμαίνονται από 0,3 έως 1,5 µg/mL και από 1,0 έως 5,0 µg/mL α-

ντίστοιχα, ενώ το LOQ της μεθόδου μετά την προσυγκέντρωση, για έναν όγκο 5 m³, κυμαίνεται από 30 έως 150 ng/m³. Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις στα πειράματα της ίδιας ημέρας κυμαίνονται από 0,2 έως 1,4% για τις συγκεντρώσεις στο εύρος 1,0 έως 50,0 μg/mL, με την επαναληψιμότητα της μεθόδου να κρίνεται ικανοποιητική.

Τέλος, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγμα που συλλέχθηκε από το κέντρο της πόλης των Ιωαννίνων. Στο δείγμα αυτό ανιχνεύθηκαν τα περισσότερα υπό μελέτη σάκχαρα σε συγκεντρώσεις από 83 ng/m³ για την μαννιτόλη έως 200 ng/m³ για τη μαννοζάνη και λεβογλυκοζάνη, μετά από την προσυγκέντρωση και διαπιστώθηκε ότι η προτεινόμενη αναλυτική μέθοδος είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική.

SUMMARY

The study of the presence of aerosols in the atmosphere is of great importance, as their effects on human and the environment is a very complex issue for the global scientific community. The study of aerosols has become a matter of great research in the past decades whereas studies have revealed their impact on human health and climate change. Also, their role in the formation processes of aerosols and their involvement in the formation of the planet's energy balance has been demonstrated. However, aerosol particles cannot be studied easily because of their complex chemical composition. For this reason, this study focused on the saccharides that are tracers of the organic sources of carbon dioxide and the course of transport of organic carbon in the atmosphere.

In the present study, a simple, rapid and easily applicable method was developed for the determination of saccharides in aerosol samples by hydrophilic interaction liquid chromatography with evaporative light scattering detection. Initially, the work involved optimization of chromatographic conditions on the basis of satisfactory saccharide resolution with reasonable retention times and good peak shape for all saccharides. The optimal chromatographic conditions were the following: column Inertsil diol, mobile phase composition ACN/H₂O 90/10 (v/v) containing 10 mM of HCOOH, pH 3,0 and flow rate 0,8 mL/min. ELSD conditions were optimized to enhance the sensitivity of detection of saccharides and therefore, the following optimal conditions were chosen: drift tube temperature 40 °C, gain 12 and nebulizer gas flow rate 3,4 L/min. Thus, according to these optimized chromatographic conditions, it was observed that saccharides exhibit typical hydrophilic interaction behaviour with the diol-silica column under the optimum conditions and an acceptable resolution is attained.

Because of the low concentrations of the saccharides in "dirty" atmospheric samples, a procedure of preconcentration by trapping the saccharides on magnetic titania was employed. Magnetic titania material not only preconcentrates the analytes and but also effects clean-up of samples eliminating interfering peaks, due to their ability saccharides to adsorb on titania, followed by the facile removal of the material from the sample extract.

The actual LOD and LOQ values of the method were determined experimentally and ranged from 0.30 to 1.50 µg/mL and from 1.00 to 5.00 µg/mL, respectively, for the selected saccharides. After preconcentration and taking into account a sampling volume of 5 m³, the LOQs range from 30 ng/m³ to 150 ng/m³. The relative standard deviations in the experiments on the same day ranging from 0,2 to 1,4% for concentrations in the range from 1,0 to 50,0 µg/mL, with the repeatability of the method being satisfactory.

Finally, the method was verified on a sample collected from the city center of Ioannina. In this sample, most of the saccharides under study were detected at concentrations of 83 ng/m³ for mannitol up to 200 ng/m³ for mannosan and levoglucosan, after preconcentration/clean-up.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΜΔΕ

Efthymia C. Paparizou, Andreas E. Karatapanis and Constantine D. Stalikas

Determination of saccharides in aerosols by hydrophilic interaction liquid chromatography-evaporative light scattering detection after preconcentration/clean-up on magnetic titania

Analytical Methods, **2013**, 5, 2802-2808