



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΥΥΠΩΝ
ΣΕ ΡΟΗ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ.
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΝΤΙΗΛΙΑΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΑΦΩΝ ΚΑΙ ΙΖΗΜΑΤΩΝ

ΑΛΕΞΙΑ ΒΟΤΑΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Ιωάννινα
Μάρτιος, 2019

© 2019 Αλεξία Βοτάνη

Η έγκριση της διπλωματικής εργασίας από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Ημερομηνία αίτησης της κ. Αλεξίας Βοτάνη: **30-10-2018**

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Επίκουρος Καθηγητής, Δημοσθένης Λ. Γκιώκας

Θέμα: «ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΡΥΠΩΝ ΣΕ ΡΟΗ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ. ΕΦΑΡΓΟΓΗ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΝΤΙΗΛΙΑΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΑΦΩΝ ΚΑΙ ΙΖΗΜΑΤΩΝ»

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

987/30-11-2018

1. Επίκουρος Καθηγητής, Δημοσθένης Λ. Γκιώκας
2. Καθηγητής, Κωνσταντίνος Σταλίκας
3. Καθηγητής, Αθανάσιος Γ. Βλεσσίδης

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διατριβής στις

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας

Η Γραμματέας του Τμήματος

Καθηγήτρια, Μαρία Λουλούδη

Ξανθή Τουτουτζόγλου

**Αφιερώνεται
στους γονείς μου**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης (Μ.Δ.Ε.) στην εξειδίκευση: «ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΣΤΙΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΣΤΗΝ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ» εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας στα πλαίσια του αναμορφωμένου Π.Μ.Σ. του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Σκοπός της εργασίας ήταν η ανάπτυξη και επέκταση των δυνατοτήτων της μεθόδου OLE-LC στην εκχύλιση πολύπλοκων δειγμάτων, όπως εδαφών και ιζημάτων για την ανάλυση μη-πολικών οργανικών ρυπαντών και συγκεκριμένα για την ανάλυση φίλτρων UV ακτινοβολίας (αντηλιακών). Επιπροσθέτως στόχος της διατριβής ήταν να αναπτύξει μια μεθοδολογία για την ποσοτική ανάλυση των αντηλιακών, επεκτείνοντας τις δυνατότητες της μεθόδου OLE-LC και στην πραγματοποίηση ποσοτικών ή ημι-ποσοτικών αναλύσεων. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε, λόγω της απλότητας και της ταχύτητας της, μπορεί να εφαρμοστεί για την άμεση ανάλυση δειγμάτων χωρίς την ανάγκη χρονοβόρων διαδικασιών εκχύλισης και προκατεργασίας δείγματος, να απλουστεύσει τις αναλύσεις ρουτίνας και να μειώσει το κόστος της ανάλυσης.

Στην εκπόνηση της εργασίας αυτής συνέβαλαν σε μεγάλο βαθμό τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντά μου, Επίκουρο Καθηγητή Δρ. Δημοσθένη Γκιώκα, για την ανάθεση του θέματος, την επίβλεψη και την καθοδήγηση του σε θεωρητικό και πειραματικό επίπεδο κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής καθώς επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και τις

συμβουλές του στην επίλυση διάφορων προβλημάτων κατά την πειραματική διαδικασία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Αθανάσιο Βλεσσίδα, καθώς και τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Σταλικά για την πολύτιμη βοήθεια και τις συμβουλές τους, καθώς και για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους στο κείμενο και στο περιεχόμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον Δρ. Γεώργιο Τσόγκα, στη διδακτορική φοιτήτρια Χολέβα Τατιάνα και στους μεταπτυχιακούς φοιτητές Γιαννούλα Γεώργιο, Κωσταρά Αναστασία και Τζώκα Στεφανία για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράσταση καθώς και την άριστη συνεργασία που μου πρόσφεραν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Χαράλαμπο και Μαρία, που με υπομονή και κουράγιο πρόσφεραν την απαραίτητη ηθική συμπαράσταση για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Αλεξία Βοτάνη

Ιωάννινα, 2019

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV)	
1.1. Βασικές έννοιες και μηχανισμοί δράσης των αντηλιακών.....	1
1.2. Κατηγορίες οργανικών φίλτρων και οι ιδιότητες τους.....	7
2. Επίδραση των οργανικών φίλτρων UV στο περιβάλλον	
2.1. Γενικά.....	9
2.2. Οι συγκεντρώσεις των φίλτρων UV στο περιβάλλον και οι παράγοντες που τις επηρεάζουν.....	11
2.3. Τοξικότητα.....	14
3. Μέθοδοι εκχύλισης και τεχνικές προσδιορισμού οργανικών φίλτρων UV	
3.1. Μέθοδοι εκχύλισης σε υγρά δείγματα.....	15
3.1.α. Μικροεκχύλιση Διασποράς Υγρού-Υγρού (DLLME) και παραλλαγές της..	15
3.1.β. Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPME)	19
3.1.γ. Εκχύλιση με προσροφητική ράβδο ανάδευσης (SBSE-Stir Bar Sorptive Extraction)	21
3.1.δ. Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE)	22
3.1.ε. Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE) σε μαγνητικά νανοσωματίδια.....	25
3.1.στ. Εκχύλιση Στερεού/Υγρού (Solid/Liquid Extraction - SLE).....	27
3.2. Μέθοδοι εκχύλισης σε στερεά δείγματα.....	28
3.2.α. Εκχύλιση Υπό Πίεση Υγρού (PLE).....	29
3.2.β. Διασπορά στερεάς φάσης του υποστρώματος (MSPD).....	30
3.2.γ. Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Μικροκύματα(MAE).....	31
3.3. Αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού αντηλιακών.....	37
3.3.α. Αέρια Χρωματογραφία (GC)	37
3.3.β. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Αποδόσεως (HPLC).....	39
Βιβλιογραφία.....	43

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. Εισαγωγή.....	51
5. Αντιδραστήρια και μέθοδοι	
5.1. Αντιδραστήρια.....	57
5.2. Εξοπλισμός.....	58
5.3. Δείγματα.....	59
5.4. Διαδικασία εκχύλισης και ανάλυσης.....	60
6. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	62
6.1. Μέγεθος σωματιδίων δείγματος.....	63
6.2. Επίδραση της προσθήκης πληρωτικού υλικού.....	63
6.3. Επίδραση του pH της κινητής φάσης.....	65
6.4. Στάδια εκχύλισης.....	67
6.5. Επίδραση της πίεσης.....	69
6.6. Επίδραση της θερμοκρασίας.....	71
6.7. Χρόνος εκχύλισης.....	72
6.8. Ποσότητα δείγματος.....	75
7. Αναλυτικά πλεονεκτήματα και ανάπτυξη μεθόδου ποσοτικοποίηση.....	77
8. Συμπεράσματα.....	83
Βιβλιογραφία.....	84

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1. Φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV)

1.1. Βασικές έννοιες και μηχανισμοί δράσης των αντηλιακών

Η μέτρια έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία έχει ευεργετικά αποτελέσματα στη σωματική και ψυχική υγεία, όπως η σύνθεση της βιταμίνης D, η καλύτερη κυκλοφορία του αίματος και η αίσθηση της ευεξίας που παράγεται από τη δράση των νευροδιαβιβαστών του εγκεφάλου. Ωστόσο, η υπερβολική έκθεση στον ήλιο μπορεί βραχυπρόθεσμα να προκαλέσει ερύθημα και μακροπρόθεσμα να οδηγήσει στην ανάπτυξη δερματικών καρκινωμάτων. Αυτό το γεγονός οφείλεται στην αύξηση της υπεριώδους ακτινοβολίας που φθάνει στη Γη και είναι επιβλαβής, ως αποτέλεσμα της αύξησης της τρυπάζ του όζοντος. Η χρήση αντηλιακών καλλυντικών προϊόντων θα μπορούσε να βοηθήσει στην πρόληψη ή την ελαχιστοποίηση των επιβλαβών συνεπειών που σχετίζονται με τον υπερβολική ηλιακή έκθεση, δεδομένου ότι περιέχουν ουσίες κοινώς γνωστές ως φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας, που προστατεύουν το ανθρώπινο δέρμα (Chisvert et al., 2012).

Θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως αντηλιακό, οποιοδήποτε καλλυντικό προϊόν που έχει στο περιεχόμενό του φίλτρα UV, προκειμένου να προστατεύσει τόσο το δέρμα όσο και τις επιφάνειες από τη βλαβερή ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία, αποφεύγοντας ή μειώνοντας τον κίνδυνο που μπορεί να προκαλέσει η ακτινοβολία στην υγεία του ανθρώπου (Salvador et al., 2005).

Έχουν περάσει περισσότερα από 18 χρόνια από τη στιγμή που εντοπίστηκαν στο περιβάλλον χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας. Η χρήση αυτών των ενώσεων αυτών αποσκοπεί στην ελαχιστοποίηση των αρνητικών επιπτώσεων που προκύπτουν από την άμεση έκθεση του ανθρώπου και των επιφανειών στο φως του ήλιου. Έκτοτε, έχουν καταβληθεί πολλές προσπάθειες για την παροχή κατάλληλων αναλυτικών μεθόδων που επιτρέπουν τον προσδιορισμό τους σε μια μεγάλη ποικιλία περιβαλλοντικών στρωμάτων (Chisvert et al., 2010).

Τα οργανικά φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας είναι ουσίες με την ικανότητα να απορροφούν την ακτινοβολία UV λόγω του μεγάλου μοριακού συντελεστή απορρόφησης στην περιοχή UVA και UVB και προστίθενται συχνά στα καλλυντικά, για να προστατεύουν το ανθρώπινο δέρμα από τις βλαβερές συνέπειες της ηλιακής ακτινοβολίας (Zenker et al., 2008).

Χρησιμοποιούνται ευρέως σε αντηλιακά, κρέμες δέρματος, καλλυντικά, σπρέι μαλλιών, λοσιόν σώματος και ούτω καθεξής με σκοπό την προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία. Τελευταία, η χρήση τους αυξήθηκε λόγω ανησυχιών για τις επιπτώσεις της υπεριώδους ακτινοβολίας στους ανθρώπους. Τα φίλτρα UV μπορούν να είναι είτε οργανικά (απορροφούν υπεριώδη ακτινοβολία) είτε ανόργανα (ανακλούν την υπεριώδη ακτινοβολία).

Όσον αφορά τα οργανικά φίλτρα, συχνά αποτελούνται από αρωματικούς δακτυλίους, τις περισσότερες φορές συζευγμένους με διπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα ή/και χαρακτηριστικές ομάδες καρβονυλίου, σε αντίθεση με τα ανόργανα φίλτρα που αποτελούνται από οξείδια του Τιτανίου (Ti) και Ψευδαργύρου (Zn). Τα οργανικά φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας απορροφούν φωτόνια και στη συνέχεια επιστρέφουν στη θεμελιώδη κατάσταση εκπέμποντας ενέργεια. Έπειτα, εφόσον δεν υπάρξει αποδόμηση ή διάσπαση τους, είναι δυνατόν να απορροφήσουν επιπλέον φωτόνια επαναλαμβάνοντας την ίδια διαδικασία, ώστε να προστατευτεί το δέρμα από την ακτινοβολία UV (Giokas et al., 2007).

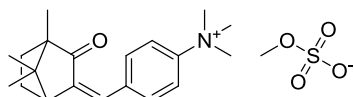
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας που είναι επιτρεπόμενα σε καλλυντικά προϊόντα (Προσαρμογή του παραρτήματος VI του κανονισμού 1223/2009¹) (Lopes et al., 2016), καθώς και οι γενικοί μοριακοί και συντακτικοί τύποι των σημαντικότερων φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας.

¹ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1223/2009 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 30^{ης} Νοεμβρίου 2009, σχετικά με τα καλλυντικά προϊόντα: Αναδιατύπωση 18.08.2015

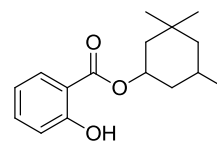
Πίνακας 1. Κατάλογος των φίλτρων UV που επιτρέπονται στα καλλυντικά προϊόντα.

Χημική Ονομασία	Εμπορική ονομασία	Ακρωνύμιο	Αριθμός CAS	Μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση σε εμπορικά σκευάσματα (% w/w)
Μεθυλοθειική N,N,N-τριμεθυλ-4-(2-οξοβορν-3-υλιδενομεθυλ)ανιλίνη	Camphor Benzalconium methosulfate	CBM	52793-97-2	6%
2-ύδροξυ-βενζοϊκός 3,3,5-τριμεθυλοκυκλοεξυλεστέρας	Homosalate	HMS	118-56-9	10%
2-υδροξυ-4-μεθοξυβενζοφαινόνη / Οξυβενζόνη	Benzophenone-3	BP3	131-57-7	10%
2-φαινυλοβενζιμιδοζολο-5-σουλφονικό οξύ και τα άλατά του με κάλιο, νάτριο και τριαιθανολαμίνη/Ensulizole	Phenylbenzimidazole Sulfonic Acid	PBSA	27503-81-7	8% (ως οξύ)
3,3'-(1,4-φαινυλοδιμεθυλενο) δις (7,7-διμεθυλ-2-οξοδικυκλο-[2.2.1] επτ-1-υλομεθανοσουλφονικό οξύ) και τα άλατά του / Ecamsule	Terephthalidene Dicamphor Sulfonic Acid		92761-26-7/ 90457-82-2	10% (ως οξύ)
1-(4-τριπ.βουτυλοφαινυλο)-3-(4-μεθοξυφαινυλο)προπανοδιόνη- 1,3 / Αβοβενζόνη	Butyl Methoxydibenzoylmethane	BMBM	70356-09-1	5%
α-(2-οξοβορν-3-υλιδενο)τολουολο-4-σουλφονικό οξύ και τα άλατά του / Αβοβενζόνη	Benzilidene Camphor Sulfonic Acid	BCS	56039—58-8	6% (ως οξύ)
2-κβάνο-3,3-διφαινυλακρυλικός 2-αιθυλεξυλεστέρας/ Οκτοκρυλένιο	Octocrylene	OCR	6197-30-4	10% (ως οξύ)
4 Πολυμερές του N-{(2 και 4)-[2-οξοβορν-3-υλιδενο]μεθυλο]βενζυλ} ακρυλαμίδιου	Polyacrylamidomethyl Benzylidene Camphor	PBC	113783-61-2	6%
4-μεθοξυκινναμωμικό-2-αιθυλεξυλιο/ Octinoxate	Ethylhexyl Methoxycinnamate	EHMC	5466-77-3	7,5 %

Αιθοξυλιωμένο 4-αμινοβενζοϊκό αιθύλιο/ Amiloxate	PEG-25 PABA	P25	116242-27-4	10%
4-μεθοξυκινναμωνικό ισοπεντύλιο	Isoamyl p-methoxycinnamate	IMC	71617-10-2	10%
2,4,6-τριανιλίνο-(π-καρβο-2-αιθυλεξυλ-1-οξύ)-1,3,5-τριαζίνη	Ethylhexyl Triazone	EHT	88122-99-0	5%
2-(2H- βεζοτριαζολ-2-υλ)-4-μέθυλο-6-(2-μέθυλο-3-(1,3,3,3-τετραμέθυλο-1-(τριμεθυλοσιλυλ)οξύ)δισυλοξάνυλο) πρόπυλο)φαινόλη	Drometrizole trisiloxane	DTS	155633-54-8	15%
Δις (αιθυλεξυλ) εστέρας του 4,4-((6-((1,1-διμεθυλαιθυλ)αμινο)καρβονυλο)φαινυλ)αμινο-1,3,5-τριαζινο-2,4-δυλο)διμινο)διβενζοϊκού οξέος/ Iscotrizinol (USAN)	Diethylhexyl Butamido Triazone	DBT	154702-15-5	10%
3-(4-μεθυλοβενζυλιδενό)-d-1-καμφορά/ Enzacamene	4-Methylbenzylidene	4MBC	38102-62-4/ 36861-47-9	4%
Διοξείδιο του Τιτανίου	Titanium Dioxide	TiO ₂	13463-67-7	25%

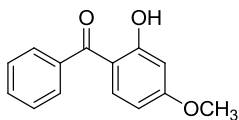


n,n,n-trimethyl-4-(2-oxoborn-3-ylidene)methyl)anilinium methyl sulfate,
 $C_{20}H_{28}NO \cdot CH_3SO_4$

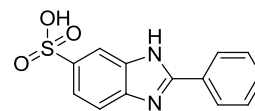


Homosalate
 $C_{16}H_{22}O_3$

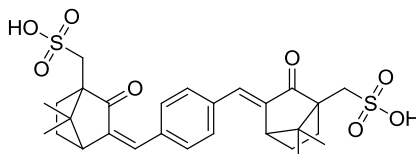
3,3,5-trimethylcyclohexyl 2-hydroxybenzoate



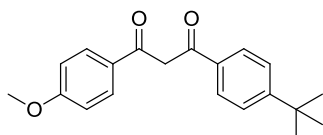
Benzophenone-3
 $HOC_6H_3(OCH_3)COC_6H_5$



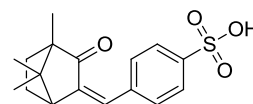
Phenylbenzimidazole Sulfonic Acid
 $C_{13}H_{10}N_2O_3S$



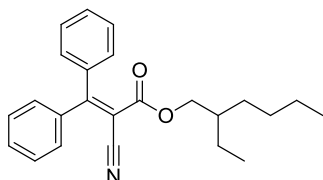
3,3'-(1,4-Phenylenedimethylidene)bis[7,7-dimethyl-2-oxo-bicyclo[2.2.1]heptane-1-methanesulfonic acid]
 Terephthalidene Dicamphor Sulfonic Acid
 $C_{28}H_{34}O_8S_2$



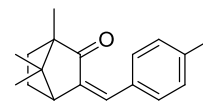
1-(4-Methoxyphenyl)-3-(4-tert-butylphenyl)-1,3-propanedione
 Butyl Methoxydibenzoylmethane
 $C_{20}H_{22}O_3$



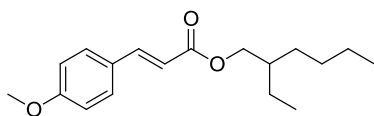
p-[(2-Oxo-3-bornylidene)methyl]benzenesulfonic acid
 Benzilidene Camphor Sulfonic Acid
 $C_{17}H_{20}O_4S$



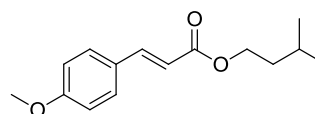
2-Ethylhexyl 2-cyano-3,3-diphenylacrylate
 Octocrylene
 $(C_6H_5)_2C=C(CN)CO_2CH_2CH(C_2H_5)(CH_2)_3CH_3$



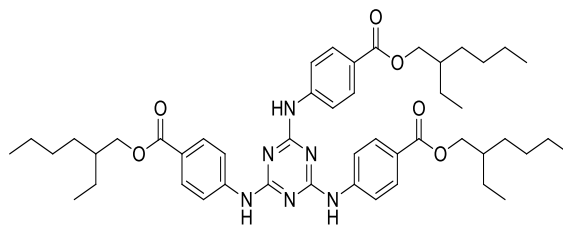
4-Methylbenzylidene camphor
 Polyacrylamidomethyl Benzylidene Camphor
 $C_{18}H_{22}O$



4-Methoxycinnamic acid 2-ethylhexyl ester,
 Ethylhexyl Methoxycinnamate
 $C_{18}H_{26}O_3$

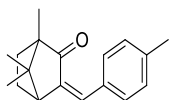


Isoamyl 4-methoxycinnamate
 Amiloxate
 PEG-25 PABA
 $C_{15}H_{20}O_3$
 h enwsh einai idia me thn Ésoamyl p-methoxycinnamate

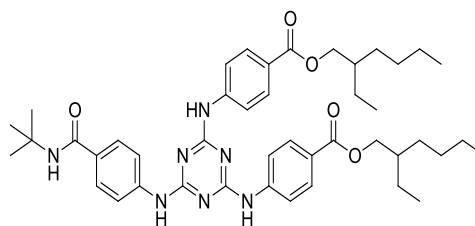


4-[[4,6-bis[[4-(2-ethylhexoxy-oxomethyl)phenyl]amino]-1,3,5-triazin-2-yl]amino]benzoic acid 2-ethylhexyl ester

Ethylhexyl Triazone
 $C_{48}H_{66}N_6O_6$

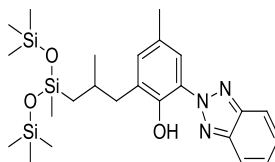


1,7,7-Trimethyl-3-[(4-methylphenyl)methylene]-bicyclo[2.2.1]heptan-2-one
 4-Methylbenzylidene
 $C_{18}H_{22}O$



Bis(2-ethylhexyl) 4,4'-[[6-[[4-(tert-butylcarbonyl)phenyl]amino]-1,3,5-triazine-2,4-diyl]diimino]dibenzoate

Diethylhexyl Butamido Triazone
 $C_{44}H_{59}N_7O_5$



2-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4-methyl-6-(2-methyl-3-(1,3,3,3-tetramethyl-1-(trimethylsilyloxy)disiloxanyl)propyl)phenol

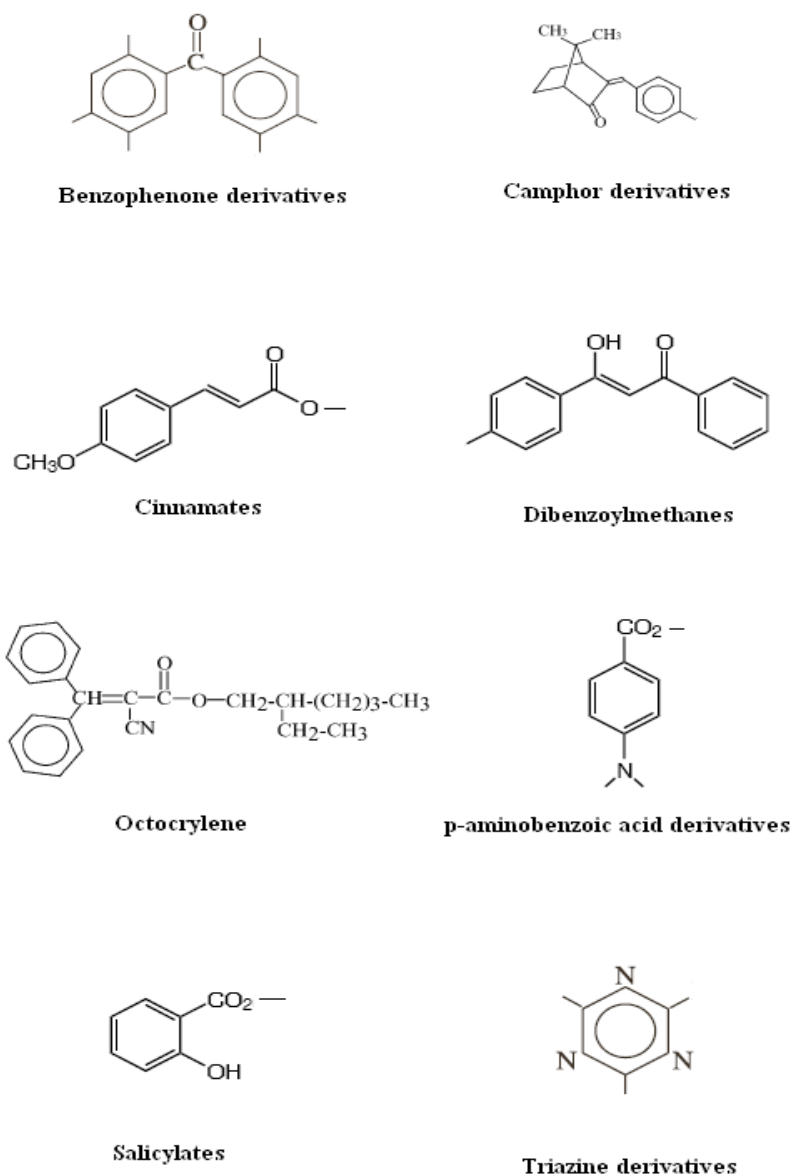
Drometrisole trisiloxane
 $C_{24}H_{39}N_3O_3Si_3$

Σχήμα 1. Μοριακοί και συντακτικοί τύποι των φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας.

1.2. Κατηγορίες οργανικών φίλτρων και οι ιδιότητες τους

Τα φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας κατηγοριοποιήθηκαν σε 9 ομάδες (Chisvert et al., 2012): τα παράγωγα του βενζιμιδαζολίου, της βενζοφαινόνης, της βενζοτριαζόλης, της καμφοράς, της τριαζίνης, το p-αμινοβενζοϊκό οξύ και τα παράγωγα του, τα μεθοξυκινναμικά, τα σαλικυλικά, και οι άλλες ουσίες (BDM, OCR, P15).

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι χημικές δομές των οργανικών φίλτρων UV που εμφανίζονται πιο συχνά στην παγκόσμια βιομηχανία:



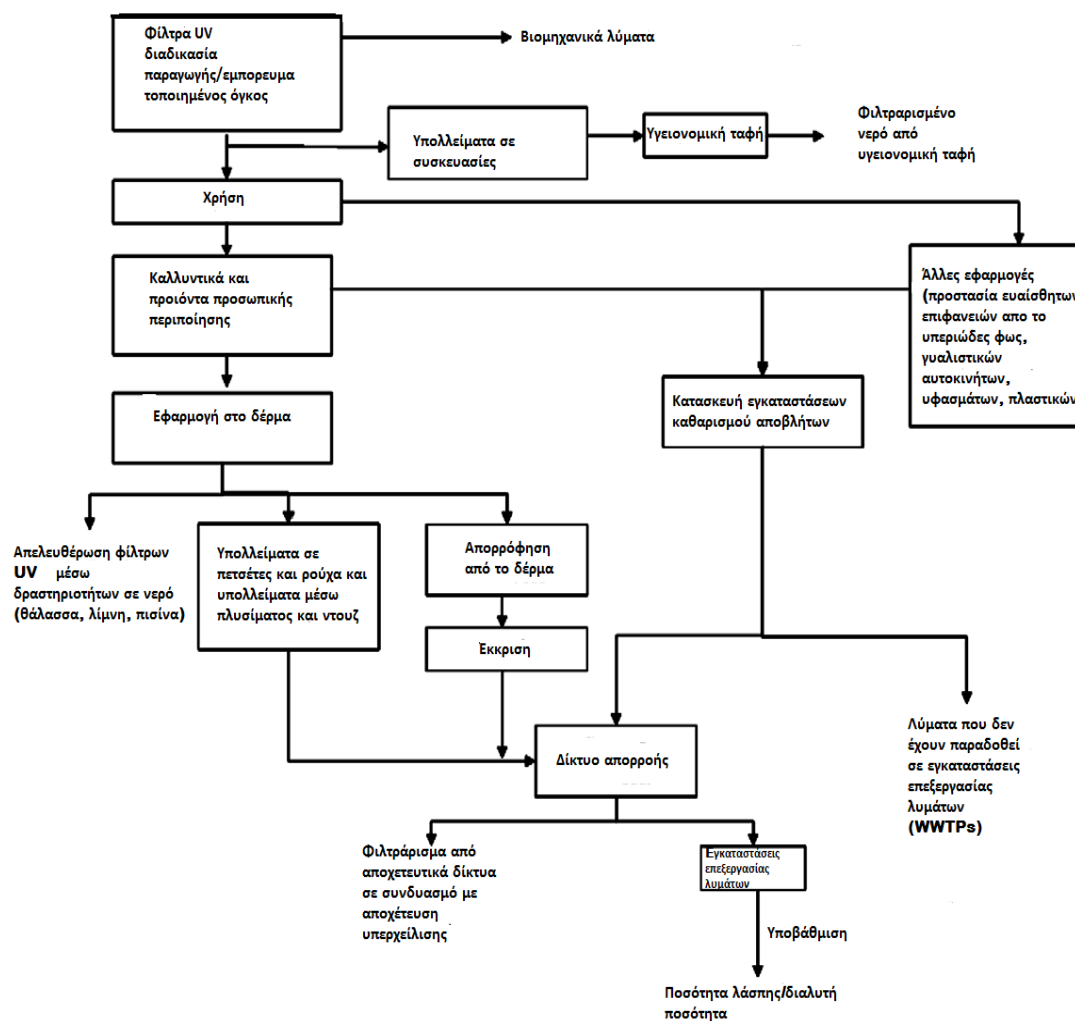
Σχήμα 2. Οργανικά φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των οργανικών φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας, καθορίζουν την τύχη τους στο περιβάλλον αλλά βοηθούν και στην επιλογή των αναλυτικών μεθοδολογιών με σκοπό τον προσδιορισμό τους σε διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα. Οι κύριες ιδιότητες είναι η διαλυτότητα, ο συντελεστής νερού-οργανικής ύλης (K_{oc}) και ο συντελεστής οκτανόλης-νερού (K_{ow}), ο οποίος είναι δείκτης που εκφράζει το πώς κατανέμονται τα φίλτρα UV μεταξύ της οκτανόλης (που αντιπροσωπεύει τα λιπίδια ή τα λίπη στους ζώντες οργανισμούς) και του νερού (υδατική φάση). Συνδέεται με την υδατο-διαλυτότητα των φίλτρων UV και δίνει πληροφορίες που αφορούν την πιθανή βιοσυσσώρευση τους σε ζωντανούς οργανισμούς. (Ramos et al., 2015)

2. Επίδραση των οργανικών φίλτρων UV στο περιβάλλον

2.1. Γενικά

Η επιστημονική κοινότητα για πολλά χρόνια ασχολούνταν με τη μελέτη της αποτελεσματικότητας των φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας, με στόχο την προστασία του ανθρώπινου δέρματος, αλλά και με την πιθανότητα ύπαρξης αρνητικών επιπτώσεων στον ανθρώπινο οργανισμό. Τις τελευταίες 2 δεκαετίες διερευνάται η πιθανότητά απελευθέρωσης τους στο περιβάλλον και όπως φαίνεται στο Σχήμα 3, τα φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας συσσωρεύονται στο περιβάλλον μέσω άμεσων και έμμεσων μηχανισμών. Στην πρώτη κατηγορία, η απελευθέρωση σε φυσικά νερά προέρχεται από την κολυμβητική δραστηριότητα των ανθρώπων, ενώ στη δεύτερη η απελευθέρωση σχετίζεται κυρίως με την απορροή των λυμάτων από εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων. (Giokas et al., 2007)



Σχήμα 3. Μηχανισμοί εισόδου των φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας στο περιβάλλον.

Από την στιγμή που θα γίνει η απελευθέρωση των αντηλιακών στο περιβάλλον, αυτά είτε φωτοαποικοδομούνται είτε προσροφώνται σε αιωρούμενα στερεά. Δύο είναι οι βασικοί μηχανισμοί με βάση τους οποίους γίνεται η φωτοαποικοδόμησή τους: η φωτόλυση και ο φωτοϊσομερισμός. Κατά τη διάρκεια της φωτόλυσης, το οργανικό μόριο διασπάται σε θραύσματα (ελεύθερες ρίζες OH· και ROO·) ή δημιουργούνται ενδιάμεσα παραπροϊόντα. Στα επιφανειακά ύδατα, οι διεργασίες φωτοαποικοδόμησης πραγματοποιούνται μέσω άμεσης ή έμμεσης φωτόλυσης. Στην πρώτη περίπτωση, τα οργανικά φίλτρα UV απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία UV και αποσυντίθενται, ενώ στην δεύτερη υπάρχει διαμεσολάβηση φωτοευαισθητοποιητών πχ η διαλυμένη οργανική ύλη (DOM), τα ενεργά είδη οξυγόνου ή άλλες ανόργανες ενώσεις (νιτρικά, όξινα ανθρακικά, χλωριούχα, κ.λ.π.) (Sanchez-Quiles et al., 2015).

Κατά τη διάρκεια της φωτόλυσης των φίλτρων UV είναι δυνατόν να παραχθούν παραπροϊόντα πιο βλαβερά από τις αρχικές ενώσεις. Ένα παράδειγμα αποτελεί η OMC που όταν εκτεθεί σε ηλιακή (υπεριώδη) ακτινοβολία, δημιουργούνται προϊόντα διάσπασης πιο βλαβερά σε σχέση με τη μη ακτινοβολημένη OMC. Η ένωση PBS, έδειξε ισχυρές οξειδωτικές ιδιότητες, ύστερα από ακτινοβόληση ουδέτερων υδατικών διαλυμάτων (pH=7) και δημιούργησε μία ποικιλία ελεύθερων ριζών και ενεργά είδη οξυγόνου (Blough et al., 1995).

Όταν πραγματοποιείται φωτοϊσομερισμός των φίλτρων UV υπάρχει η δυνατότητα να παραχθούν παραπροϊόντα, που να απορροφούν λιγότερη υπεριώδη ακτινοβολία απ' ό,τι οι αρχικές ενώσεις (Serpone et al., 2002). Διάφορα φίλτρα UV βρίσκονται στο περιβάλλον με τη μορφή cis και trans, εξαιτίας της ύπαρξης ενός εξωκυκλικού διπλού δεσμού C=C που συνδέεται με τον αρωματικό δακτύλιο. Διάφορα εμπορικά σκευάσματα περιέχουν ενώσεις που είναι σε μορφή trans και με την έκθεσή τους σε ακτινοβολία UV μετατρέπονται σε cis ισομερή (Poiger et al., 2004). Υπάρχει περίπτωση τα δύο ισομερή να είναι χειρικά και να περιλαμβάνουν εναντιομερή, που να έχουν τις ίδιες φυσικοχημικές ιδιότητες ωστόσο διαφέρουν στη βιολογική τους συμπεριφορά και τοξικότητα (Diaz-Cruz et al., 2008).

2.2. Οι συγκεντρώσεις των φίλτρων UV στο περιβάλλον και οι παράγοντες που τις επηρεάζουν

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τις συγκεντρώσεις των οργανικών φίλτρων UV στο περιβάλλον είναι η ένταση, η τοποθεσία (πισίνα, λίμνη, θάλασσα, ποτάμι), και το ποσοστό των ανθρώπινων δραστηριοτήτων σε αυτό. Τις πιο ζεστές ημέρες του καλοκαιριού και ειδικά τις μεσημεριανές ώρες, έχουν καταγραφεί οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, καθώς εξαιτίας της αυξημένης ηλιακής ακτινοβολίας, η εφαρμογή των αντηλιακών είναι πιο συχνή (Ramos et al., 2015).

Διάφορες οργανικές ενώσεις UV έχουν βρεθεί σε θάλασσες, σε ποτάμια, σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (εισροή και εκροή), σε υπόγεια ύδατα κοντά σε αστικές περιοχές αλλά και σε νερό βρύσης. Αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα νερού που συλλέχθηκαν από δύο πισίνες, έδειξαν τιμές συγκέντρωσης 2,4-3,3 και 2,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ για BP-3 και OD-PABA, αντίστοιχα, ενώ δείγματα νερού από την εκροή του ντους ήταν στην περιοχή 8.2-9.9 και 5.3-6.2 $\mu\text{g L}^{-1}$, αντίστοιχα (Lambroulou et al., 2002). Αργότερα, έγινε έλεγχος διαφόρων δειγμάτων φυσικών υδάτων σε ολόκληρη την Ελλάδα και αναφέρθηκαν για πρώτη φορά ίχνη από φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας σε παράκτια θαλάσσια ύδατα (για παράδειγμα, μετρήθηκαν 1,8 ng L^{-1} της BP-3 στο Ιόνιο και 6.5-8.2 ng L^{-1} σε άλλες δύο τουριστικές περιοχές της Βορειοδυτικής Ελλάδας (Giokas et al, 2004) (Giokas et.al, 2005). Δείγματα από τη λίμνη Šobec, η οποία είναι γνωστή για την υψηλή κολυμβητική δραστηριότητα τους καλοκαιρινούς μήνες, έδειξαν για το HM-BP συγκέντρωση 820 ng L^{-1} (Kotnik et al., 2014). Εξετάστηκαν ακόμη δείγματα από λύματα, νερό και ψάρια που προήλθαν από Ελβετικές λίμνες και διαπιστώθηκε η εμφάνιση τεσσάρων σημαντικών ενώσεων φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας (BP-3, 4-MBC, OMC και OC) με χρήση της GC-MS (Balmer et al., 2005). Όπως αναμενόταν, υπήρχαν και τα τέσσερα φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας στα απόβλητα με μέγιστη συγκέντρωση 19 $\mu\text{g L}^{-1}$ για το EHMC, σε καλοκαιρινή περίοδο όπου οι συγκεντρώσεις είναι οι μέγιστες.

Με βάση αυτά τα στοιχεία, διαπιστώνεται ότι η άμεση απελευθέρωση τέτοιων ουσιών στο περιβάλλον είναι ποσοτικά σημαντική. Σε νερά του Ειρηνικού Ωκεανού βρέθηκαν ορισμένα οργανικά UV φίλτρων, αποδεικνύοντας την ανθεκτικότητα αλλά και τη μεγάλη διασπορά τους στο θαλάσσιο περιβάλλον.

Ανίχνευση οργανικών φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας έχει γίνει ακόμα και σε στερεά δείγματα, πχ σε ιζήματα, στο έδαφος, σε αμμώδεις παραλίες, και στη

λάσπη. Εποχική διακύμανση παρατηρήθηκε στη λάσπη, όπως και στα απόβλητα, με τις μέγιστες συγκεντρώσεις κατά τη θερινή περίοδο (Plagellat et al., 2006).

Όσον αφορά τα θαλάσσια ιζήματα, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις για την 4-MBC και την ODP κυμαίνονται από 150-790 ng/g. Στα ιζήματα των ποταμών, υπάρχει πιο έντονη διακύμανση των συγκεντρώσεων από αυτή στα θαλάσσια ιζήματα. Σε ιζήματα λιμνών, έχει γίνει ανίχνευση της ένωσης OMC σε συγκεντρώσεις από 14 ng/g έως 34 ng/g αλλά και της OCR μεταξύ 61 - 93 ng/g. Εξαιτίας της εμφάνισης τέτοιων ενώσεων στα ιζήματα, υπάρχει πιθανός κίνδυνος για βενθικούς οργανισμούς (Sanchez-Quiles et al., 2015). Αξιοσημείωτο είναι ακόμη, πως μεγάλες συγκεντρώσεις ανιχνεύτηκαν σε ιλύ λυμάτων, αποδεικνύοντας πως οι ενώσεις αυτές δεν βιοαποικοδομούνται κατά την βιολογική επεξεργασία των αποβλήτων. Μια κύρια χρήση της ιλύος είναι η εφαρμογή της ως λίπασμα στη γεωργία, γεγονός που αποτελεί ένα μονοπάτι μόλυνσης για τα εδάφη, τα ζώα αλλά ακόμη και τον άνθρωπο (Ramos et al., 2016).

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται δεδομένα αναφορικά με τα επίπεδα συγκεντρώσεων κάποιων οργανικών φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας σε περιβαλλοντικά δείγματα.

Πίνακας 2. Επίπεδα συγκεντρώσεων ορισμένων οργανικών φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας σε περιβαλλοντικά δείγματα (Diaz-Cruz et al., 2008).

Δείγμα/Υπόστρωμα	UV φίλτρα					
	BP3	OD-PABA	4-MBC	OMC	OC	BM-DBM
Υδατα						
Πισίνα (μg/l)	2,4-3,3	2,1				
Ντουζ (μg/l)	9,9-8,2	6,2-5,3				
Ιόνιο Πέλαγος (ng/l)	1,4-2,2		Ίχνη			n.d
Παιδική πισίνα (ng/l)	4,8-6,6		4,3-6,5	2,6-3,4		
Οικιακό ντουζ στις 12.00 μμ (ng/l)	5,1-7,9		11,9-14,3	6,5-8,3		n.d
Οικιακό ντουζ στις 15.00 μμ (ng/l)	6,6-9,8		18,4-21,0	9,6-11,8		
Λίμνη Ζυρίχης (ng/l)	<2-4		<2-22	<2-25	<2(LOD)	<20(LOD)
Μονάδες επεξεργασίας αστικών λυμάτων						
Νερό εισροής (mg/l)	0,7-7,8		0,6-6,5	0,5-19	0,1-6,1	
Νερό εκροής (mg/l)	<0,01-0,3		0,06-2,7	<0,01-0,1	<0,01-0,3	
Έδαφος, ιζήματα, λάσπη						
Λυματολάσπη (mg/kg)				150-4980	10-390	320-18740
Βιομηχανική αποχέτευση (ng/kg)	27					
Χώμα εδάφους (ng/kg)	730-4910					
Ίζημα (ng/kg)	n.d					
Ζώντες οργανισμοί						
Πέστροφα (ng/g)				50-1800		40-1700
Λευκοκορέγονος (whitefish)	n.d			n.q	72	

2.3. Τοξικότητα

Τα φίλτρα UV μπορούν να παραμείνουν στο περιβάλλον, για μεγάλη χρονική διάρκεια εξαιτίας της υψηλής λιποφιλικότητας ($\log K_{ow}$: 4-8) και της χαμηλής βιοδιάσπασης και τελικά συσσωρεύονται σε ιζήματα, στη χλωρίδα και την πανίδα (Brausch et al., 2011) (Giokas et al., 2007) καθώς δύσκολα αποικοδομούνται, ακόμη και σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι μερικά φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας έχουν οιστρογονικές και άλλες ενδοκρινικές δράσεις που μπορεί να επηρεάσουν ακόμα και τον άνθρωπο.

Η πραγματοποίηση πειραμάτων σε ανθρώπινα κύτταρα, βατράχια και ψάρια απέδειξε ότι τα οργανικά φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας είναι δυνατόν να δημιουργήσουν ορμονικές διαταραχές. Ορισμένες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ψάρια, οδήγησαν στο συμπέρασμα πως οι συγκεντρώσεις φίλτρων UV, της τάξης των $\mu\text{g/l}$ για τις BZ3, BZ4 και OMC, ίσως προκαλέσουν ορμονικές διαταραχές αλλά και μεταβολή σε γονίδια. Ακόμη, φίλτρα όπως οι 4-MBC και EMC μπορούν να χαρακτηριστούν ως ενδοκρινικοί διαταράκτες (endocrine disruptor compounds, ECDs) (Ramos et al., 2015). Μεταξύ των φίλτρων UV, το οκτοκυκλάνιο προκαλεί μεγάλη ανησυχία δεδομένου ότι έχει υψηλή λιποφιλικότητα (K_{ow} 6.88). Το συγκεκριμένο φίλτρο UV έχει ήδη ανιχνευτεί στους ιστούς ήπατος των δελφινιών με συγκεντρώσεις της τάξεως των 89-782 ng/g lw και υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να μεταφερθεί από τη μητέρα μέσω του πλακούντα και πιθανώς και μέσω του μητρικού γάλακτος (Subedi et al., 2012).

Επιπλέον πειράματα υποδεικνύουν τα οργανικά φίλτρα UV ως τοξικά για κάποιους υδρόβιους μικροοργανισμούς, όταν βρίσκονται σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις. Για παράδειγμα, το φυτοπλαγκτόν του είδους *Desmodesmus Subspicatus*, εμφάνισε τοξικότητα ως προς τα φίλτρα UV, BZ-3, 3-BC και 4-MBC σε επίπεδα συγκεντρώσεων 0,96 mg/l , 6,99 mg/l και 7,66 mg/l αντίστοιχα (Paredes et al., 2014). Τα θαλάσσια ασπόνδυλα του είδους *Myrtilus Galloprovincialis* (μύδια), *Paracentrotus Lividus* (αχινοί) και *Siriela Armata* (μαλακόστρακα) εμφάνισαν μεγαλύτερη τοξικότητα στις ουσίες 4-MBC και OMC σε συγκεντρώσεις περίπου 190 $\mu\text{g/l}$ για το *S.Armata* και 855 $\mu\text{g/l}$ για το *P.Lividus*.

Όπως ήταν αναμενόμενο, τα φίλτρα UV περιλαμβάνονται στον κατάλογο των αναδυόμενων μολυσματικών ουσιών, λόγω της αυξανόμενης χρήσης και της παρουσίας τους στο υδάτινο περιβάλλον (Richardson et al., 2005) και διάφορες μελέτες παρακολούθησης πραγματοποιούνται στην Ευρώπη.

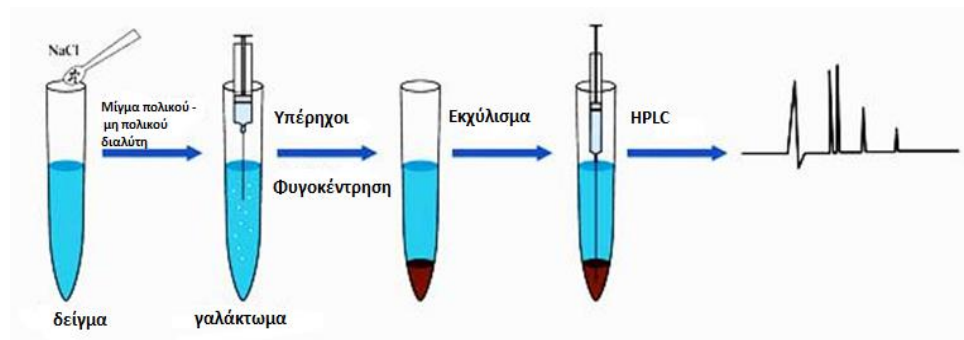
3. Μέθοδοι εκχύλισης και τεχνικές προσδιορισμού οργανικών φίλτρων UV

3.1. Μέθοδοι εκχύλισης σε υγρά δείγματα

Τα χαμηλά επίπεδα φίλτρων UV σε περιβαλλοντικά δείγματα και οι πιθανές παρεμποδίσεις από συστατικά που συνυπάρχουν στην μήτρα του υποστρώματος του δείγματος, απαιτούν την εφαρμογή κατάλληλης διαδικασίας προετοιμασίας των δειγμάτων πριν από την ανάλυση. Πληθώρα αναλυτικών μεθοδολογιών έχει χρησιμοποιηθεί περιλαμβάνοντας εκχύλιση τόσο υγρής όσο και στερεής φάσης όπως και μεθόδους μικροεκχύλισης. Κάθε μία από αυτές τις μεθόδους έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και η επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η πολυπλοκότητα του υποστρώματος, η τεχνική ανίχνευσης και οι ενώσεις υπό ανάλυση.

3.1.α. Μικροεκχύλιση Διασποράς Υγρού-Υγρού (DLLME) και παραλλαγές της

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη σχετική διαλυτότητα των αναλυτών σε δύο μη αναμίξιμα υγρά. Μικρή ποσότητα του από έναν μη πολικό διαλύτη διασπείρεται μετά από έντονη ανάμιξη με έναν πολικό διαλύτη εντός της υδατικής φάσης. Κατά τη διάρκεια της διασποράς, σχηματίζονται μικρογαλακτώματα στα οποία πραγματοποιείται η εκχύλιση των αναλυτών μέσω μηχανισμών διάχυσης και προσρόφησης (Tarazona et al., 2010). Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από τη χρήση μικρής ποσότητας διαλυτών και από την υψηλή απόδοση της εκχύλισης. Έτσι είναι δυνατή η γρήγορη μεταφορά μάζας ανάμεσα στο δείγμα και τον διαλύτη εκχύλισης, με αποτέλεσμα την αποδοτικότερη εκχύλιση και τη μεγαλύτερη προσυγκέντρωση, σε σχέση με την κλασική Υγρή Εκχύλιση (LE) (Rezaee et al., 2006).



Σχήμα 4. Στάδια DLLME

Λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει αυτή η μέθοδος εκχύλισης (δηλαδή, γρήγορη, φθηνή, εύχρηστη και χαμηλή κατανάλωση οργανικού διαλύτη) έχει γίνει μια πολύ δημοφιλής για τον προσδιορισμό οργανικών και ανόργανων ενώσεων σε διάφορους τύπους δειγμάτων (Tarazona et al., 2014).

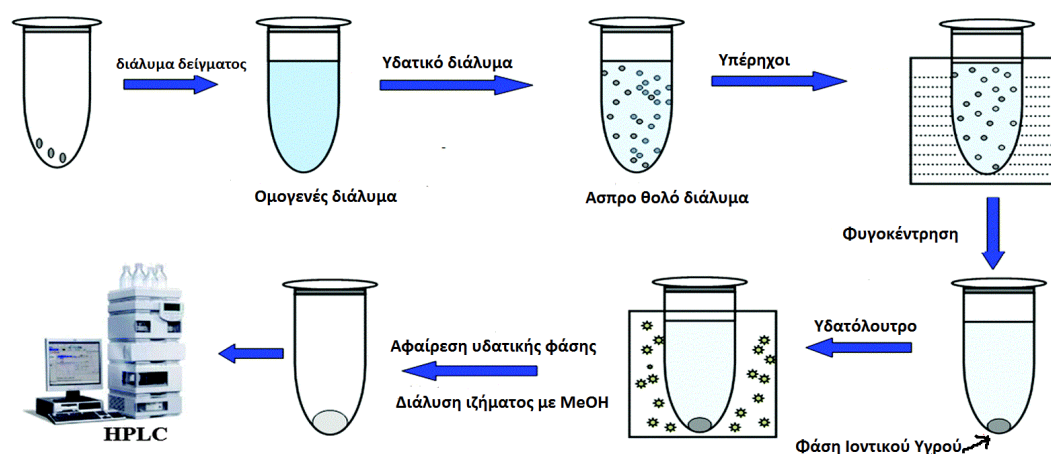
Παραλλαγές της μεθόδου DLLME που έχουν εφαρμοστεί για την ανάλυση οργανικών φίλτρων UV σε περιβαλλοντικά δείγματα είναι:

- *Μικροεκχύλιση διασποράς ιοντικών υγρών (IL-DLLME)*

Η IL-DLLME στηρίζεται σε ένα τριφασικό σύστημα διαλύτη που περιέχει μικροσκοπικά σταγονίδια ιοντικού υγρού (IL) στο δείγμα που σχηματίζεται με διάλυση κατάλληλης ποσότητας διαλύτη εκχύλισης, σε μία μικρή ποσότητα πολικού διαλύτη (διαλύτης διασποράς). Στις βέλτιστες συνθήκες, αυτή η μέθοδος παρέχει καλή επαναληψιμότητα και όρια ανίχνευσης της τάξεως του 0,2-5 ng/ml. Είναι μια μέθοδος απλή, γρήγορη, και φιλική προς το περιβάλλον που στοχεύει σε υδατικά δείγματα (Zhang et al., 2012).

- *Μικροεκχύλιση διασποράς γαλακτωμάτων ιοντικών υγρών υποβοηθούμενη από υπέρηχους (IL-USAEME)*

Η IL-USAEME και η IL-DLLME βασίζονται στην ίδια αρχή, με την πρώτη να πλεονεκτεί διότι η χρήση υπερήχων αυξάνει την ταχύτητα μεταφοράς μάζας ανάμεσα σε δύο μη αναμιξίμες φάσεις.

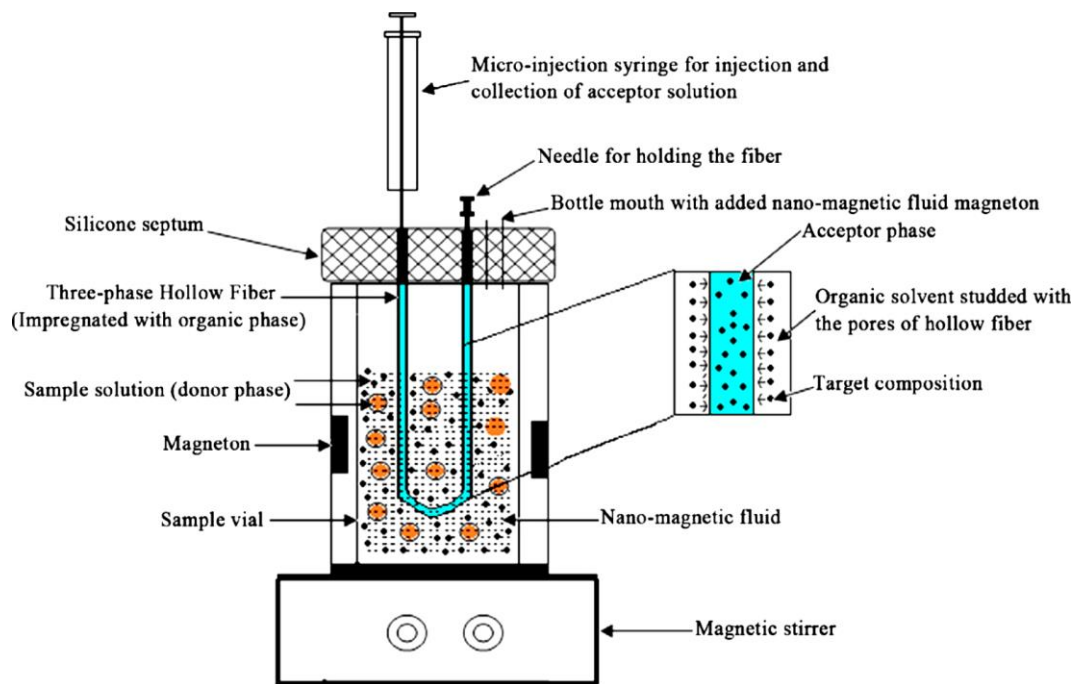


Σχήμα 5. Στάδια IL-USAEME

Με τη χρήση αυτής της μεθόδου, οι ανακτήσεις των φίλτρων υπερϊόδους ακτινοβολίας κυμαίνονται μεταξύ 83,9-116,2%, υπάρχουν χαμηλά όρια ανίχνευσης και καλή επαναληψιμότητα. Είναι φιλική προς το περιβάλλον, καθώς χρησιμοποιεί ως διαλύτη εκχύλισης ιοντικά υγρά, αντί των κοινών οργανικών διαλυτών (Regueiro et al., 2008).

- *Μικροεκχύλιση βασισμένη σε ένα υγρή φάση (HF-LPME)*

Είναι μία μεθοδολογία τριών φάσεων και που εκχυλίζει και προσυγκεντρώνει αναλύτες διαφορετικών πολικιοτήτων. Γενικά παρουσιάζει χαμηλά όρια ανίχνευσης, καλή επαναληψιμότητα και ανακτήσεις από 95,17-99,82%, ωστόσο απαιτεί μεγάλο χρόνο εκχύλισης (16h) (Yang et al., 2011).



Σχήμα 6. Διάταξη HF-LPME.

- *Μικροεκχύλιση σταγόνας ιοντικών υγρών (IL-SDME)*

Αυτή η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση ενός ιοντικού υγρού με την μορφή σταγόνας. Είναι μία οικονομική μέθοδος, που έχει φανεί χρήσιμη τόσο ως μέθοδος προσυγκέντρωσης, όσο και ως μέθοδος καθαρισμού των δειγμάτων. Έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση έξι οργανικών φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας, με τις ανακτήσεις να κυμαίνονται μεταξύ 92-115%. Ωστόσο, τα όρια ανίχνευσης δεν ήταν τα αναμενόμενα (0,06-3 µg/l) αν και αυτό θα μπορούσε να βελτιωθεί με τη χρήση ανιχνευτή μεγαλύτερης ευαισθησίας (Vidal et al., 2010).

- *MALLE (εκχύλιση υγρού-υγρού βασισμένη σε μεμβράνη)*

Στην MALLE χρησιμοποιούνται μεμβράνες από πολυμερικά υλικά με σκοπό την εκχύλιση των αναλυτών. Όσον αφορά την εκχύλιση οργανικών φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας από υδατικά δείγματα, έγινε χρήση μεμβρανών πολυαιθυλενίου υψηλής πυκνότητας, με τις ανακτήσεις να κυμαίνονται μεταξύ 76-101% και τα όρια ανίχνευσης από 0,4-16 ng/L.

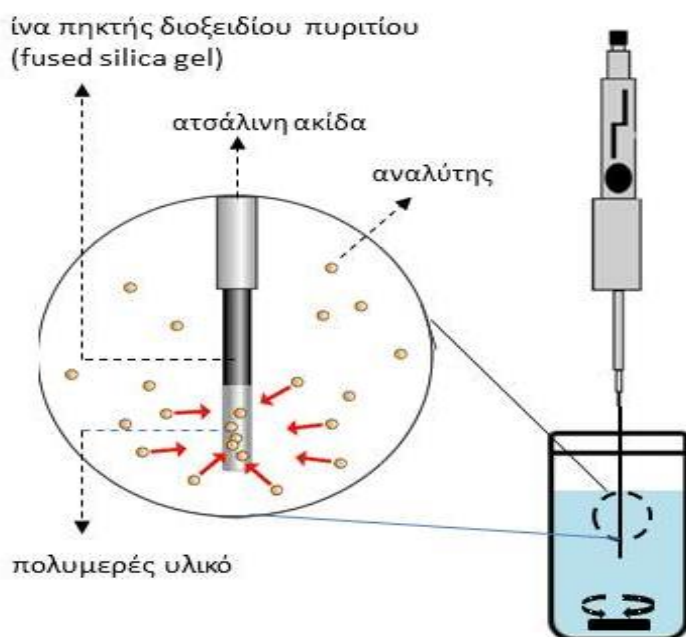
Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η μικρή ποσότητα δείγματος και όγκου που χρησιμοποιήθηκε κατά την εκχύλιση, αλλά και το γεγονός πως η μεμβράνη βοηθάει στην αποτελεσματική απομόνωση των μορίων μεγάλου μοριακού βάρους ενώ αποφεύγει την παρεμβολή των μορίων του υποστρώματος. Μειονέκτημα αυτών των μεμβρανών είναι πως εμφανίζουν φαινόμενα μνήμης ειδικά για λιπόφιλους αναλύτες, όπως είναι για παράδειγμα τα οργανικά φίλτρα UV ακτινοβολίας (Rodil et al., 2009b), αλλά επειδή έχουν χαμηλό κόστος, δεν είναι απαραίτητο να επαναχρησιμοποιηθούν.

- *Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικκύλια (MME)*

Μια ακόμη αποτελεσματική μέθοδος είναι η MME που στηρίζεται στην προσυγκέντρωση των αναλυτών σε μικκύλια μη ιοντικών επιφανειοδραστικών ενώσεων κατά την αύξηση της θερμοκρασίας του διαλύματος. Σε ιδανικές πειραματικές συνθήκες, οι ανακτήσεις κυμαίνονται από 95-102%. Ένα πλεονέκτημα της μεθόδου που αξίζει να αναφερθεί είναι η απλή διαδικασία εκχύλισης (Giokas et al., 2005), ωστόσο η περίσσεια της ποσότητας του επιφανειοδραστικού ίσως προκαλέσει παρεμπόδιση στον ανιχνευτή. Αυτό μπορεί να διορθωθεί με επανεκχύλιση των αναλυτών σε μικρή ποσότητα μη πολικών διαλυτών, όπου τα επιφανειοδραστικά έχουν περιορισμένη διαλυτότητα

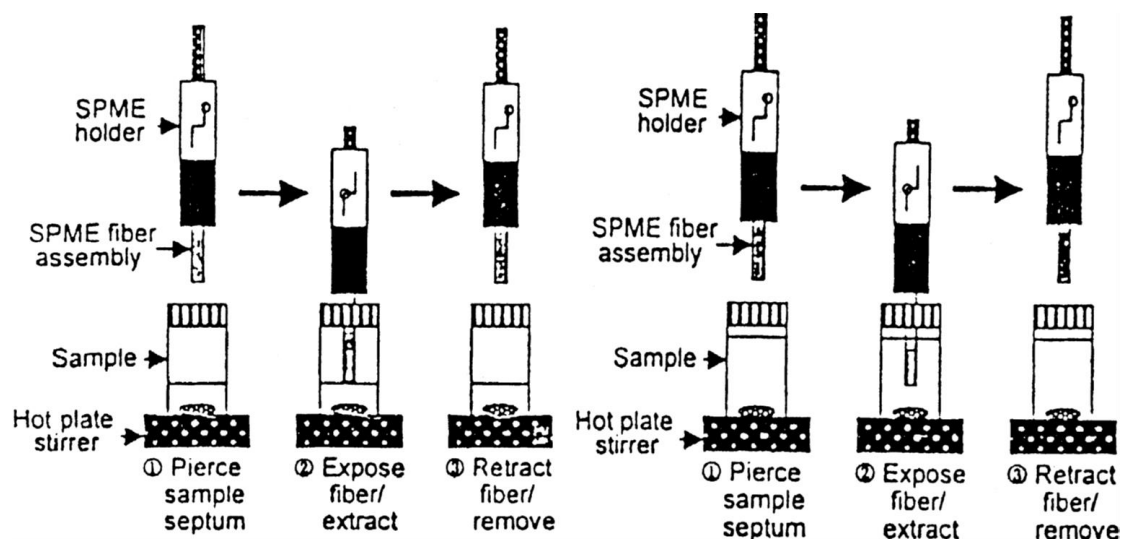
3.1.β. Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPME)

Μια άλλη μέθοδος είναι η SPME, που περιλαμβάνει την χρήση μίας μικροίνας, φτιαγμένη από διοξείδιο του πυριτίου και επικαλυμμένη με ένα υδρόφοβο πολυμερές (συνήθως Πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο-PDMS και παράγωγα αυτού). Στηρίζεται στην κατάτμηση του αναλύτη ανάμεσα στο υποστρώματος του δείγματος και στην στατική φάση. Έτσι επιτυγχάνεται ισορροπία ανάμεσα στη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα και στην ποσότητα του αναλύτη που έχει προσροφηθεί πάνω στην ίνα.



Σχήμα 7. Διάταξη SPME

Ισορροπία επιτυγχάνεται είτε με άμεση βύθιση της ίνας μέσα στο δείγμα (direct, DI-SPME), είτε με έκθεση της σε φάση ατμού (headspace, HS-SPME) (Σχήμα 8). Έπειτα, η ίνα ενσωματώνεται σε GC ή στην HPLC και γίνεται απομάκρυνση των αναλυτών με θερμική ή υγρή εκρόφιση, αντίστοιχα (Aulakh et al., 2005).



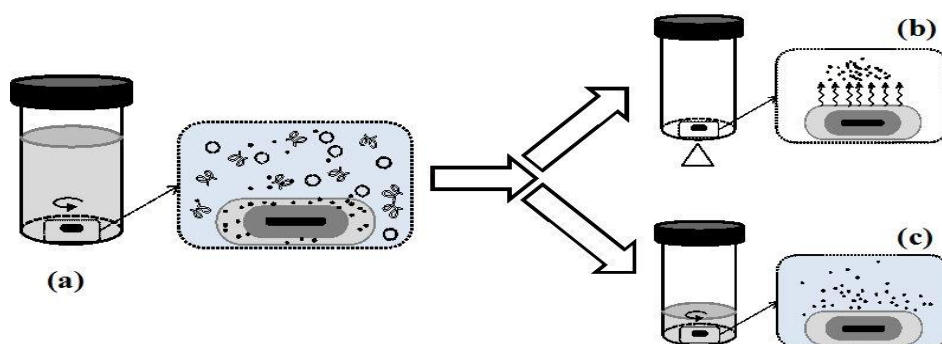
*

Σχήμα 8. *Headspace-SPME, Direct-SPME.*

Η εκχύλιση των ES, HMS, BP1, BP3, BP πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ίνας τύπου PDMS-DVB και Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης *headspace* (HS-SPME) με τις τιμές των ανακτήσεων να κυμαίνονται από 89-115% (Negreira et al., 2009).

3.1.γ. Εκχύλιση με προσροφητική ράβδο ανάδευσης (SBSE-Stir Bar Sorptive Extraction)

Η συγκεκριμένη μέθοδος σχετίζεται με την SPME και στηρίζεται στην εκχύλιση των αναλυτών από το υπόστρωμα του υγρού δείγματος, πάνω σε μία μαγνητική ράβδο επικαλυμμένη με πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS). Πραγματοποιείται με υγρή ή με θερμική εκρόφηση και ενώ πλεονεκτεί λόγω της χρήσης μικρής ποσότητας δείγματος (10 έως 50 ml), η διαδικασία εκχύλισης είναι αρκετά χρονοβόρα (120 έως 180 min) (Benede et al., 2016).



Σχήμα 9. Διάταξη SBSE

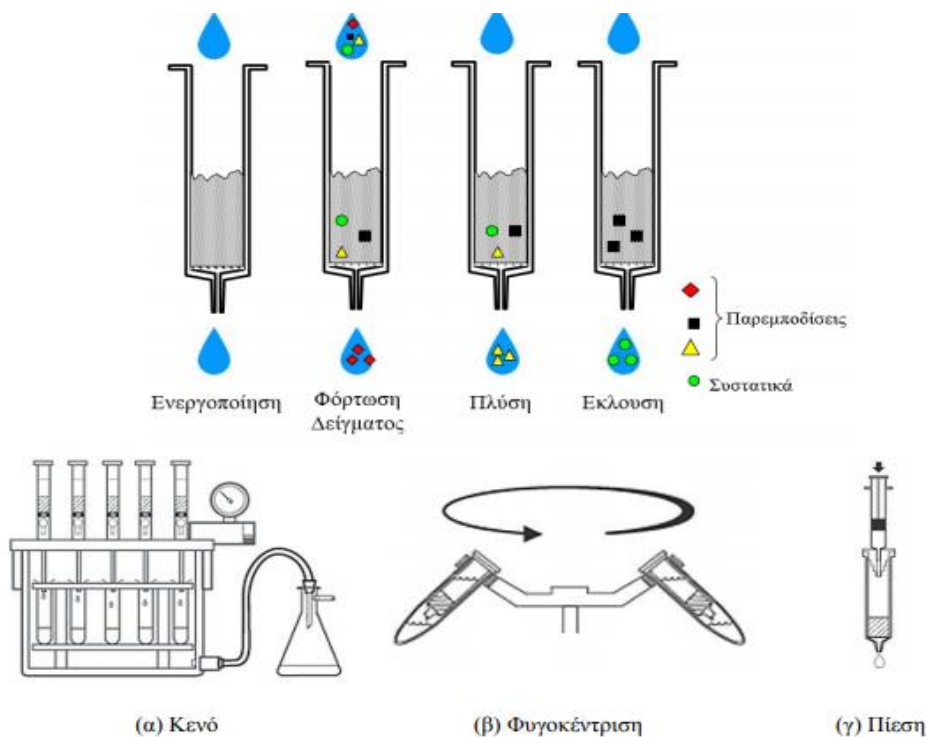
Στην περίπτωση της υγρής εκρόφησης, πέντε UV φίλτρα (BP3, OD-PABA, HMS, EHS, OC) είχαν ανακτήσεις που κυμαίνονταν από 64-88% (Magi et al., 2012). ενώ στην θερμική εκρόφηση, οι ενώσεις 4-MBC, BM-BDM, EHS, BP3, EHMC, OC, OD-PABA και HMS είχαν ανακτήσεις από 63-122% (Rodil et al., 2008).

3.1.δ. Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE)

Η αρχή της SPE περιλαμβάνει την κατανομή των εκχυλιζόμενων συστατικών ανάμεσα σε 2 φάσεις: τη στερεή φάση που αποτελεί το προσροφητικό υλικό και την υγρή που αποτελεί το υπόστρωμα (με όλες τις πιθανές παρεμποδίσεις). Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις πρέπει να εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τις ομάδες της στερεής φάσης, έτσι ώστε να διαχωριστούν. Η παραλαβή των ενώσεων από το στερεό υπόστρωμα γίνεται με την επιλογή κατάλληλων διαλυτών. Οι διαμοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των προσδιοριζόμενων συστατικών, των ενεργών ομάδων στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού και της υγρής φάσης του υποστρώματος του δείγματος ή του διαλύτη, είναι υπεύθυνες για τους διάφορους μηχανισμούς συγκράτησης και έκλυσης των ενώσεων. Τα στάδια της SPE είναι (Σχήμα 10):

- ενεργοποίηση του προσροφητικού,
- φόρτωση του δείγματος,
- έκπλυση για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων πολικών συστατικών του υποστρώματος,
- έκλυση του δείγματος με τον κατάλληλο διαλύτη ή μίγμα διαλυτών,
- εξάτμιση του διαλύτη.

Στην εκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιούνται υλικά πλήρωσης παρόμοια με αυτά που χρησιμοποιούνται στην HPLC, αλλά σε άλλη κοκκομετρική σύσταση. Οι μηχανισμοί διαχωρισμού περιλαμβάνουν SPE αντίστροφης φάσης, για μη πολικές ενώσεις με χρήση μη πολικού προσροφητικού υλικού π.χ. κυκλοεξυλο, οκτυλο-, δεκαοκτυλο-σιλάνιο. Ο διαχωρισμός στην SPE αντίστροφης φάσης βασίζεται σε ελκτικές δυνάμεις van der Waals ή δυνάμεις διασποράς. Η παραλαβή της επιθυμητής ένωσης στη συνέχεια γίνεται με χρήση κατάλληλου διαλύτη.

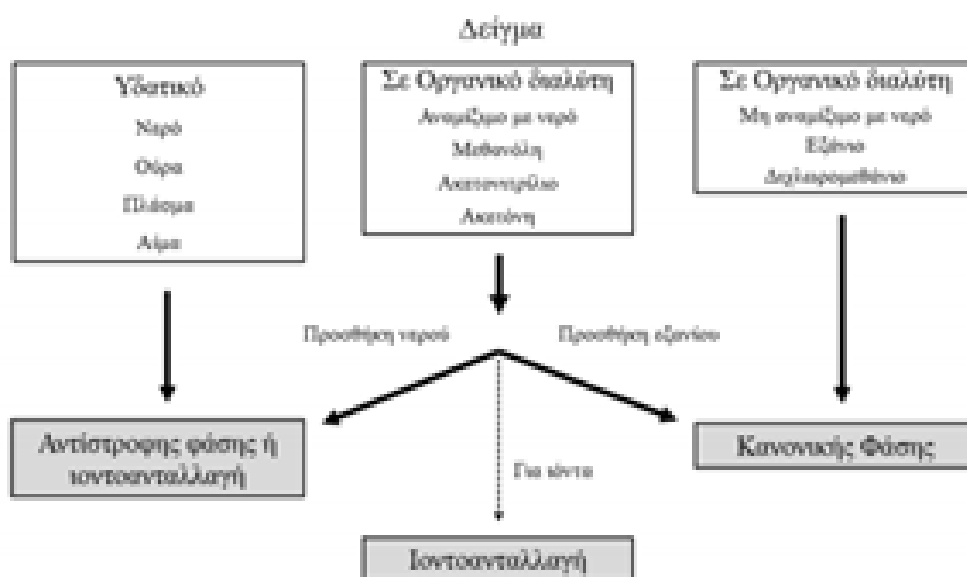


Σχήμα 10. Στάδια και τρόποι εφαρμογής της Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (SPE)

Η SPE κανονικής φάσης, που εφαρμόζεται για πολικές ενώσεις και στηρίζεται στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με το δεσμευμένο προσροφητικό του silica gel με ομάδες, όπως CN-, NH₂-, -NH₂CH₂CH₂NH₂-.

Η SPE με ιοντοανταλλαγή, η οποία χρησιμοποιείται για ενώσεις, που σε υδατικό διάλυμα είναι σε ιονισμένη μορφή. Ο κύριος μηχανισμός συγκράτησης της ένωσης βασίζεται στις ηλεκτροστατικές έλξεις της φορτισμένης δραστικής ομάδας του συστατικού προς τις φορτισμένες ομάδες, οι οποίες είναι συνδεδεμένες στο υπόστρωμα του silica gel. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται σουλφονυλο-, καρβοξυλο-, διαιθυλαμινο- και τριμεθυλαμινο- ομάδες, για τη δημιουργία δεσμευμένης φάσης. Για τη συγκράτηση μιας ένωσης στον ιοντοανταλλάκτη από ένα υδατικό διάλυμα, πρέπει το pH του δείγματος να είναι τέτοιο, ώστε και η προσδιοριζόμενη ένωση και η δραστική ομάδα που είναι προσδεμένη στο προσροφητικό να είναι φορτισμένες. Για την αποδέσμευση των συστατικών αρκεί είτε αυτά είτε το υπόστρωμα να βρίσκονται σε μη ιονισμένη μορφή. Εναλλακτικά χρησιμοποιείται διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος ή διάλυμα, το οποίο περιέχει ιόντα που αντικαθιστούν (άρα δρουν ανταγωνιστικά) την ένωση. Η επιλογή του κατάλληλου μηχανισμού εξαρτάται μεταξύ άλλων από το υπόστρωμα του δείγματος και τις ιδιότητες των συστατικών. Στην SPE, εκτός από τα πυριτικά υλικά,

χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο πολυμερικά υλικά, τα οποία πλεονεκτούν έναντι των πυριτικών προσροφητικών επειδή παραμένουν σταθερά σε ένα μεγάλο εύρος pH. Τα υλικά αυτά, επίσης, χαρακτηρίζονται από τις μικτές τους ιδιότητες, καθώς περιέχουν ομάδες με υδρόφιλο και ομάδες με λιπόφιλο χαρακτήρα (<https://repository.kallipos.gr>).



Σχήμα 11. Επιλογή μηχανισμού SPE.

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), είτε offline είτε online, είναι η πιο ευρέως εφαρμοσμένη μέθοδος εκχύλισης και εμπλουτισμού των φίλτρων UV από υγρά δείγματα. Μεγάλοι όγκοι δείγματος (π.χ. 500-1000 mL) συνήθως διηθούνται μέσα σε φουσίγια ή δίσκους SPE και τα φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας εκλούνται με κατάλληλους οργανικούς διαλύτες. Οι διαλύτες έκλουσης εξατμίζονται μέχρι ξηρού και επαναδιαλύονται σε μικρό όγκο διαλύτη συμβατό με την αναλυτική τεχνική που θα ακολουθήσει.

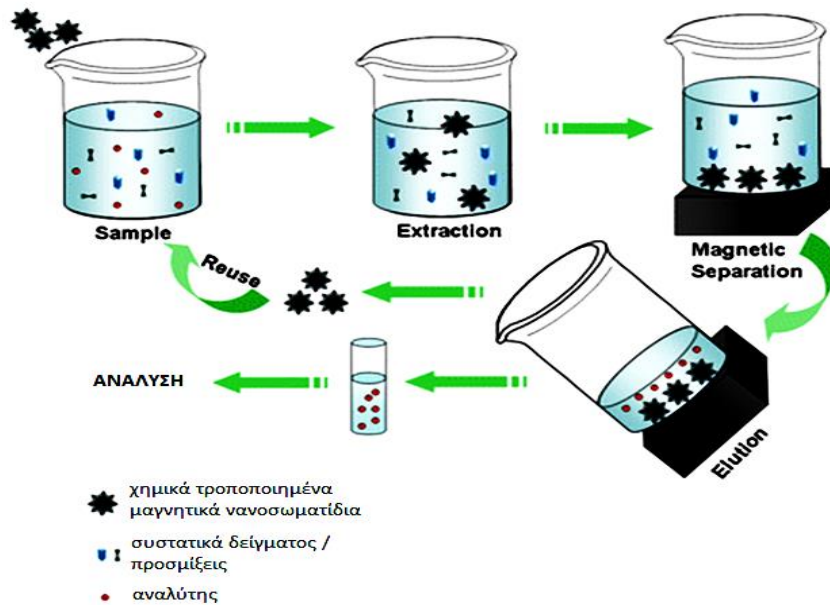
Η ευρεία αποδοχή της SPE ως αναλυτική μέθοδος οφείλεται στη διαθεσιμότητα μιας πληθώρας εμπορικά διαθέσιμων απορροφητικών ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την προσαρμογή της αναλυτικής μεθόδου στις ανάγκες της ανάλυσης. Οι απορροφητικές ουσίες που συνήθως χρησιμοποιούνται

είναι αυτές που επιτρέπουν τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των πολικών αλλά και των μη πολικών φίλτρων UV, όπως το συμπολυμερές πολυβινυλοπυρρολιδόνης-διβινυλοβενζολίου (PVP-DVB) ή το συμπολυμερές πολυστυρενδιβινυλοβενζολίου που έχει τροποποιηθεί με ομάδες πυρρολιδόνης (PS-DVB / MP) ή υδροξυλίου. Σε περίπτωση μη πολικών φίλτρων UV, χρησιμοποιείται το οκταδεκυλ-σίλικα (C₁₈) ή το συμπολυμερές πολυστυρένιο-διβινυλοβενζολίου (PS-DVB). Για περισσότερο πολικές ενώσεις (π.χ. BZ4, PBS, κλπ.) το συμπολυμερές PVP-DVB τροποποιημένο με εναλλάκτη κατιόντων (PVP-DVB / MCX) παρέχει αυξημένη απόδοση, επειδή οι πολικές ενώσεις συγκρατούνται από τις ιοντοανταλλακτικές μονάδες, ενώ οι μη πολικές ενώσεις εξακολουθούν να έλκονται από τον λιγότερο πολικό PVP-DVB. (Environmental Monitoring of Cosmetic Ingredients, Alberto Chisvert et al., 2018).

3.1.ε. Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE) σε μαγνητικά νανοσωματίδια

Η εκχύλιση στερεάς φάσης με χρήση μαγνητικών νανοσωματιδίων (*MNP's based d-SPE*), στηρίζεται στην εκχύλιση των οργανικών φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας πάνω στην επιφάνεια ενός προσροφητικού υλικού που έχει μαγνητικές ιδιότητες.

Η ανάπτυξη υδρόφιλων και υδρόφοβων μαγνητικών προσροφητικών υλικών στοχεύει στην εκχύλιση οργανικών φίλτρων με διαφορετικές πολικότητες. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση οκτώ μη πολικών οργανικών φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας (BZ3, IMC, MBC, EMC, OCR, EDP, ES, HS) σε δείγματα νερού με χρήση μαγνητικών νανοσωματιδίων επικαλυμμένων με ελαιικό οξύ (C₆Fe₂O₄@oleic acid) όπως και εκχύλιση τεσσάρων υδρόφιλων φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας (TDS, PBS, PDT, και BZ4) με χρήση μαγνητικών νανοσωματιδίων επικαλυμμένων με nylon 6 C₆Fe₂O₄@nylon-6). Οι ανακτήσεις ήταν ικανοποιητικές με τις τιμές να κυμαίνονται από 63-110% για τις μη πολικές ενώσεις (Roman et al., 2011) και από 91-115% για τις πολικές ενώσεις (Benede et. al., 2016).



Σχήμα 12. Εκχύλιση Στερεάς Φάσης με τη χρήση μαγνητικών νανοσωματιδίων (MNP's based SPE).

Τα πλεονεκτήματα αυτής της εκχύλισης είναι αρκετά καθώς είναι γρήγορη, εύκολη, και δεν απαιτούνται επιπρόσθετα βήματα καθαρισμού κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Επιπλέον είναι οικονομική, διότι δεν καταναλώνονται μεγάλες ποσότητες ακριβών διαλυτών και σε σχέση με την κλασική SPE, οι χρόνοι εκχύλισης είναι μικροί. Η μεγάλη ειδική επιφάνεια των νανουλικών οδηγεί στη γρήγορη μεταφορά μάζας ανάμεσα στο δείγμα και το εκχυλιστικό μέσο, ενώ τα μαγνητικά νανοσωματίδια ανακτώνται εύκολα με τη βοήθεια μαγνήτη (Roman et al., 2011). Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι πως πολλές φορές τα μαγνητικά προσροφητικά υλικά δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα άρα πρέπει να γίνει η σύνθεσή τους (Ramos et al., 2015).

3.1.στ Εκχύλιση Στερεού/Υγρού (Solid/Liquid Extraction - SLE)

Η εκχύλιση στερεού-υγρού (Solid Liquid Extraction-SLE) αναφέρεται στην κλασική τεχνολογία εκχύλισης, η οποία επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση του κατάλληλου διαλύτη, οποίος διαλύει επιλεκτικά την ένωση που μας ενδιαφέρει, όχι όμως και το υπόστρωμα. Η πιο κοινή μορφή της τεχνικής SLE είναι η μέθοδος “shake-filter” η οποία περιλαμβάνει την προσθήκη ενός οργανικού διαλύτη για τις οργανικές ενώσεις ή αραιού οξέος ή βάσης για τις ανόργανες ενώσεις, στο δείγμα και την ανάδευση, για να επιτρέψει στις ενώσεις να διαλυθούν στο υγρό περιβάλλον, έως ότου παραληφθούν πλήρως. Η διαδικασία εκχύλισης μπορεί να επιταχυνθεί με θέρμανση, καθώς και με επίδραση υπερήχων ή και μικροκυμάτων. Οι αδιάλυτες ενώσεις απομακρύνονται στη συνέχεια με διήθηση ή φυγοκέντρηση. (<https://repository.kallipos.gr>)

Με χρήση υπερήχων η μέσω μηχανικής ανατάραξης, τα φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας εκχυλίζονται με μίγματα μη πολικών και πολικών οργανικών διαλυτών. Ανάλογα με το υπόστρωμα και το μίγμα των διαλυτών, η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται (τυπικά δύο ή τρεις φορές) και μετά από φυγοκέντρηση ή διήθηση, το εκχύλισμα εξατμίζεται συνήθως σε μικρό όγκο για να ενισχυθεί ο παράγοντας προσυγκέντρωσης και να διευκολυνθεί η περαιτέρω επεξεργασία και ο καθαρισμός του. Εξαιτίας της πολυπλοκότητας του υποστρώματος, το εκχύλισμα καθαρίζεται ώστε να μην υπάρχουν προσμίξεις που θα επηρεάσουν την χρωματογραφική ανάλυση που θα ακολουθήσει.

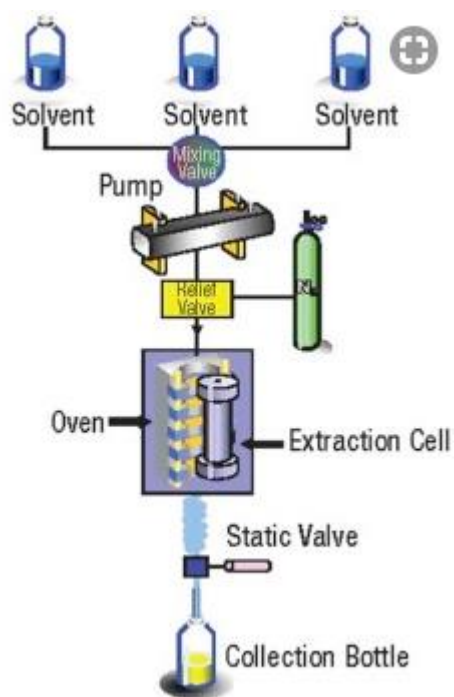
3.2 Μέθοδοι εκχύλισης σε στερεά δείγματα

Λόγω των υψηλών συντελεστών κατανομής οκτανόλης-νερού των περισσότερων φίλτρων UV ακτινοβολίας ($\log K_{ow} > 3$), τα εδάφη, τα ιζήματα και η λυματολάσπη έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά υποστρώματα για τη συσσώρευσή τους. Σε αντίθεση με την ανάλυση δειγμάτων νερού, για τα οποία οι μέθοδοι που βασίζονται στο LLE είναι ελάχιστες, η υγρή-υγρή εκχύλιση είναι η κύρια μέθοδος που επιλέγεται για την ανάλυση στερεών δειγμάτων (βλ. Πίνακα 3). Συνήθως, τα φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας εκχυλίζονται με μίγματα μη πολικών και πολικών οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούν υπερήχους ή μηχανική ανάδευση).

Ανάλογα με το υπόστρωμα και το μίγμα των διαλυτών η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται (τυπικά δύο ή τρεις φορές) και, μετά από φυγοκέντρωση ή διήθηση, το εκχύλισμα καθαρίζεται από τυχόν προσμίξεις που συνεκλούνται και παρεμποδίζουν την ανάλυση (συνήθως με τεχνικές χρωματογραφίας). Τέλος, το εκχύλισμα εξατμίζεται σε μικρό όγκο για να αυξηθεί ο συντελεστής προσυγκέντρωσης.

3.2.α Εκχύλιση Υπό Πίεση Υγρού (PLE)

Η εκχύλιση υπό πίεση υγρού (PLE) είναι μια δημοφιλής τεχνική κατεργασίας δειγμάτων για στερεά υποστρώματα με περιορισμένη κατανάλωση διαλύτη, εξαιρετική απόδοση εκχύλισης και δυνατότητα αυτοματοποίησης των σταδίων εκχύλισης και καθαρισμού. Η PLE, σε συνδυασμό με τον καθαρισμό εντός της στήλης και χρησιμοποιώντας ενεργό διοξείδιο του πυριτίου, έχει αναφερθεί ως εναλλακτική λύση για τη χρωματογραφία αερίου-φασματομετρία μάζας (GC-MS) ως προς τον προσδιορισμό των φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας σε δείγματα ιζήματος με χαμηλή περιεκτικότητα σε άνθρακα (Negrreira et al., 2011). Η μέθοδος επιτρέπει την εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης, η οποία παράγει ταχύτερες και αποδοτικότερες εκχυλίσεις, καθώς αυτοί οι παράγοντες έχουν σημαντικό αντίκτυπο στη διαλυτότητα των αναλυόμενων ουσιών, τη μεταφορά μάζας και τη διάσπαση της αλληλεπίδρασης υποστρώματος-αναλύτη. (Rodil et al., 2008).



Σχήμα 13. Εκχύλιση υπό πίεση υγρού.

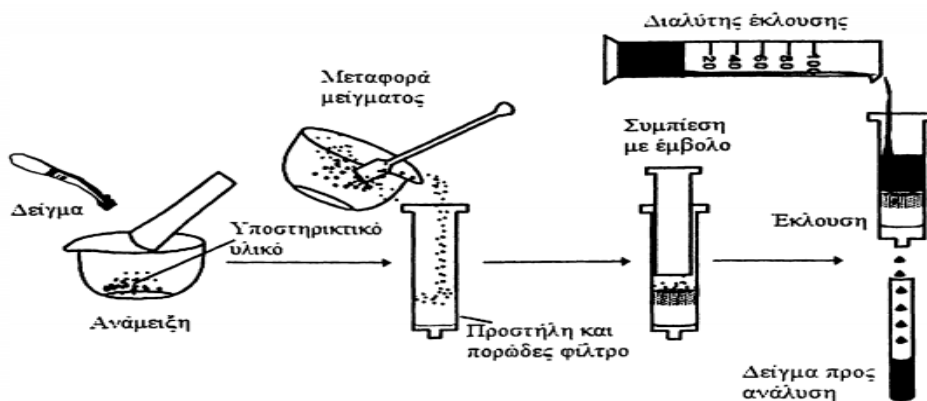
3.2.β Διασπορά στερεάς φάσης του υποστρώματος (MSPD)

Η διασπορά στερεάς φάσης Matrix (MSPD) έχει βρει εφαρμογή ως μια γενική αναλυτική διαδικασία για την παρασκευή, εκχύλιση και κλασμάτωση στερεών, ημιστερεών και / ή υψηλού ιξώδους βιολογικών δειγμάτων.

Η απλότητα και η ευελιξία της συμβάλλουν στο να επιλέγεται αντί για πιο κλασσικές μεθόδους εκχύλισης στερεών δειγμάτων. Η MSPD βασίζεται σε μηχανική ανάμιξη, για να παραχθεί πλήρης διαταραχή του δείγματος και να επιτευχθεί αλληλεπίδραση του υποστρώματος με ένα στερεό προσροφητικό υλικό.

Σε πρώτη φάση, η ανάμιξη ενός στέρεου προσροφητικού υλικού [όπως οκταδεκυλσιλυλ (ODS) - παραγωγοποιημένο διοξείδιο του πυριτίου (C₁₈)] με ένα βιολογικό δείγμα θεωρείται ότι ενεργεί ως λειαντικό, που παράγει δυνάμεις διάτμησης και άλεσης, προκαλώντας διαταραχή της δομής του δείγματος και οδηγεί στην πλήρη διάσπαση και διασπορά του δείγματος. Με αυτό τον τρόπο, το δείγμα διασκορπίζεται πάνω από την επιφάνεια του προσροφητικού υλικού, παράγοντας, μέσω υδρόφοβων και υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων των διαφόρων συστατικών, μια μοναδική φάση μικτού χαρακτήρα για την απομόνωση των αναλυτών.

Τελευταία, πολλές εφαρμογές της τεχνικής MSPD συμπεριλαμβάνουν την ανάμιξη δειγμάτων με διοξείδιο του πυριτίου που δεν έχει υποστεί διάλυση (τζελ διοξειδίου του πυριτίου, άμμος, κ.λπ.) ή άλλα οργανικά (γραφιτικές ίνες) ή ανόργανα (Florisil, αλουμίνα, κλπ) στερεά που προκαλούν διαταραχή του δείγματος, αλλά δεν φαίνεται να έχουν τις ίδιες ιδιότητες διασποράς. Το MSPD προτιμάται σε πολλές εφαρμογές, διότι εξαλείφει τις περισσότερες από τις επιπλοκές της εκτέλεσης κλασσικών εκχυλίσεων υγρού-υγρού ή / και εκχύλισης στερεάς φάσης και ημιστερεών δειγμάτων σε ιδιαίτερα πολύπλοκα βιολογικά δείγματα (Barker, 2007).

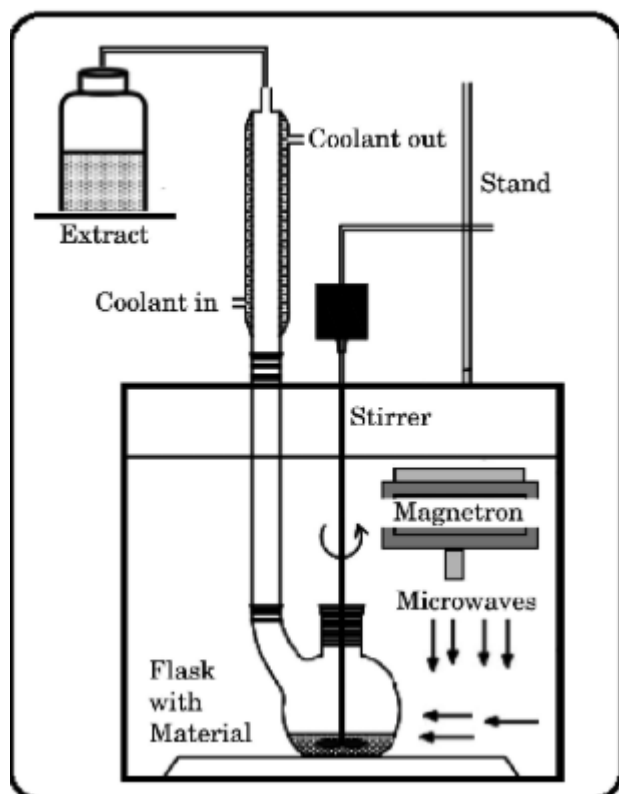


Σχήμα 14. Βήματα σε μια κλασσική διαδικασία MSPD

3.2.γ Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Μικροκύματα(MAE)

Με τις συμβατικές τεχνικές η θερμότητα μεταδίδεται από τη θερμαντική πλάκα στο δοχείο θέρμανσης και από εκεί στο διάλυμα. Αντίθετα με την εκχύλιση με μικροκύματα, η θέρμανση ξεκινάει από το δείγμα και αναπτύσσεται σε όλη τη μάζα του δείγματος με κατεύθυνση από μέσα προς τα έξω, μιας και το δοχείο δεν απορροφά την ακτινοβολία των μικροκυμάτων (<https://pergamos.lib.uoa.gr>). Η μέθοδος αυτή προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες μεθόδους όπως η χαμηλή κατανάλωση διαλύτη, μικρούς χρόνους εκχύλισης και ταυτόχρονης εκχύλισης πολλών δειγμάτων.

Η επιλογή διαλύτη για την MAE είναι σημαντική, καθώς ο διαλύτης πρέπει να είναι σε θέση να απορροφήσει την ενέργεια των μικροκυμάτων και η πολικότητα του πρέπει να είναι παρόμοια με αυτή των υπό εκχύλιση ενώσεων. Η ποσότητα ενέργειας που απορροφάται από την ακτινοβολία μικροκυμάτων είναι αναλογική ως προς τη διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη, η οποία πρέπει να είναι σε θέση τόσο να απορροφά την ενέργεια όσο και να μπορεί να τη μετατρέψει σε θερμότητα. Ως εκ τούτου, οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται, επιλέγονται κυρίως με βάση τη διηλεκτρική σταθερά αλλά και την πολικότητα τους.(Kotnik et. al., 2014).



Σχήμα 15. Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Μικροκύματα

Η μέθοδος αυτή έχει εφαρμοστεί σε παράγωγα βενζοφαινόνης, κάποια από τα οποία ήταν φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας. Οι περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες για την εκχύλιση τέτοιων παραγώγων αφορούν τη χρήση υπερήχων για εκχύλιση. Έτσι έγινε σύγκριση μεταξύ της αποτελεσματικότητας της MAE και της υποβοηθούμενης από υπερήχους εκχύλισης και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η MAE έδωσε υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης. Έτσι φάνηκε η καλύτερη αποδοτικότητα της εκχύλισης των ιζημάτων από μικροκύματα, συγκριτικά με την εκχύλιση με υπερήχους. Οι ανακτήσεις της συγκεκριμένης μεθόδου ήταν 80 έως 99%. Για δείγματα ιζημάτων από 0,1 έως 1,4 ng g⁻¹ (Kotnik et al., 2014).

Πίνακας 3. Μέθοδοι προσδιορισμού της ακτινοβολίας UV σε στερεά δείγματα (με χρονολογική σειρά).

Ενώσεις	Δείγμα	Μέθοδος κατεργασίας δείγματος	Αναλυτική τεχνική	MLOD (ng/g)	Ανάκτησεις (%)	Συγγραφείς
EHMC, EHT, MBC, OC	SS	SLE + SPE: ξηρό δείγμα 60 g (+ 3 g NaCl). εκχυλίζεται με 20mLπεντανίου / ακετόνης +20mLδιαιθυλαιθέρα / διχλωρομεθάνιο (30 λεπτά έκαστος). Ξηραίνεται με Na ₂ SO ₄ , εξατμίζεται μέχρι ξηρού και επαναδιαλύεται σε 1 mL εξάνιου.Υποβάλλεται σε SPE με silica και 50-70 mL εξάνιο / διαιθυλαιθέρα. Έπειτα εξατμίζεται μέχρι ξηρού και επαναδιαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα (για GC) ή αιθανόλη (για LC).	LC-UV (για EHT) GC-MS (EI ⁺) (για τα υπόλοιπα)	57 3-6	75 88-101	Plagellat et al. (2006)
BZ, BZ1, BZ3, BZ8 και άλλες βενζοφαινόνες	SE	SLE + LLE: δείγμα 10 g (+10g Na ₂ SO ₄). εκχυλίζεται με 20 mL μεθανόλης (20 λεπτά). Εξατμίζεται έως 3 mL, αναμιγνύεται με 1 mL 5% NaCl και εκχυλίζεται με 5 ml οξικού αιθυλεστέρα. Έπειτα εξατμίζεται μέχρι ξηρού και παραγωγοποιείται με 50 μl MSTFA (80 ° C, 30 λεπτά)	GC-MS(EI ⁺)	0.1	60-125	Jeon et al. (2006)
BZ3, EHDP, EHMC, EHS, HMS, IMC, MBC, OC	SE	PLE : δείγμα 4-5 g (+1 g Na ₂ SO ₄).Εκχυλίζεται με 4x5 λεπτά οξικού αιθυλεστέρα / εξάνιο, (160 ° C, 100 bar) εξατμίζεται μέχρι 0,5 mL παραγωγοποιείται 50μL BSTFA (25°C, 60λεπτα).	GC-MS(EI ⁺)	2-6	73-128	Rodil and Moeder (2008b)
BZ3, EHDP, OC, PBSA και άλλες ενώσεις	SS	PLE: ξηρό δείγμα 1 g ε κχυλίζεται με 2x5 λεπτά μεθανόλη + 2x5 λεπτά νερό (pH 7) / μεθανόλη. (100 ° C, 140 bar)	LC-MS/ MS(EI ^{+/+})	1.5-3.5	79-108	Nieto et al. (2009)

EHS, HMS, IMC, EHMC, MBC, OC	ID	MSPD: δείγμα 0,5 g (+ 0,5 g Na ₂ SO ₄). Εκχυλίζεται με C ₁₈ /προσροφητικό silica · εκλούεται με 4 mL. ακετονιτρίλιο και εξατμίζεται μέχρι 1 mL.	GC-MS/ MS(ESI ^{+/-})	3-12	77-99	Negreira et al. (2009c)
BMDM, BZ3, DHBT, EHDP, EHMC, EHS, EHT, HMS, IMC, MBC, OC	SS	PMAL: 0,5 g ξηρού δείγματος (+ 1 mL οξικού αιθυλεστέρα / εξάνιου) σε LDPE bags. εκχυλίζεται με 4x5 λεπτά οξικό αιθυλεστέρα / εξάνιο, (70 ° C, 10mPa) εξατμίζεται μέχρι ξηρού και επαναδιαλύεται σε 0,5 ml μεθανόλης / νερού.	LC-MS/ MS(APPI ^{+/-})	0.3-25	95-124	Rodil et al. (2009d)
BZ1, BZ2, BZ3, BZ4, PBSA και άλλες ενώσεις	SS	PLE + SPE: 0,2 g ξηρού δείγματος εκχυλίζονται με 4x10 λεπτά νερό / μεθανόλη (80 ° C) σε τελικό όγκο 30 mL. Αραιώνεται στα 800 mL με νερό και υποβάλλεται σε SPE όπως περιγράφεται για τα υγρά δείγματα).	LC-MS/ MS(ESI ^{+/-})	0.75-7.5	74-118	Wick et al. (2010)
BZ3, EHDP, EHMC, EHS, HMS, IMC, MBC, OC	SS	PLE + SPE: δείγμα 0,5 g (+ 2 g διατομιτη) εκχυλίζεται με 1x5 λεπτά εξάνιο /διγλωρομεθάνιο. (75 ° C. 103.4 bar) και εξατμίζεται μέχρι 1 mL.Υποβάλλεται σε SPE, με χρήση διαχωριστικής μικροστήλης PSA και 5mL εξάνιου/αιθέρα. Κατόπιν εξατμίζεται μέχρι ξηρού και επαναδιαλύεται σε 1 mL ισοοκτανίου.	GC-MS(EI ⁺)	5.2-18.5	73-112	Negreira et al. (2011b)
BZ3, EHDP, EHMC, EHS, HMS, MBC, OC κ.α	SE, SS	SLE + SPE: ξηρό δείγμα 4 g εκχυλίζεται με 2 x 10 mL διγλωρομεθάνιο + 2 x 10 mL ακετόνη (10 λεπτά το καθένα). Υποβάλλεται σε SPE με χρήση διαχωριστικής μικροστήλης MgSiO ₃ και 2 x 40 ml ακετόνης / εξάνιου. Ξανά SPE με φυσίγγιο γραφίτη και 10 mL τολουολίου / ακετόνης. Τέλος SPE με χρήση διαχωριστικής μικροστήλης NH ₂ και 20mL εξάνιο + 7 ml ακετόνης / εξάνιου. όπου εξατμίζεται έως 200 μL)	GC-MS(EI ⁺)	0.05-2.0	70-125	Kameda et al (2011)

BZ1, BZ2, BZ3, BZ8 κ.α	SE, SS	SLE + SPE: 0,1-1 g ξηρό δείγμα εκχυλίζεται με 3x5mL μεθανόλη (30 λεπτά έκαστος). Εξατμίζεται έως 0.5 mL, αραιώνεται με νερό και υποβάλλεται σε SPE, με χρήση διαχωριστικής μικροστήλης PVP-DVB (1mL / λεπτό) και 6 ml μεθανόλης / οξικού αιθυλεστέρα. όπου τελικά εξατμίζεται έως 1 mL.	LC-MS/MS(ESI ⁻)	0.041– 0.67	38–116	Zhang et al. (2011b)
BZ1, BZ3, EHDP, EHMC, MBC, OC κ.α	SE, SS	PLE : ξηρό δείγμα 1 g (+ 1 g Al ₂ O ₃). εκχυλίζεται με 2x5 λεπτά μεθανόλη + 2x5 λεπτά μεθανόλη / νερό (100 ° C, 100 bar) σε τελικό όγκο 20 mL Κατόπιν αραιώνεται σε 25mL με μεθανόλη και 2mL αυτού του δείγματος εξατμίζονται μέχρι ξηρού και επαναδιαλύονται σε 250 μL ακετονιτρίλιο.	LC-MS/MS(ESI ⁺)	0.5–15 (SE) 0.2–60 (SS)	58–125 (SE) 30–102 (SS)	Gago-Ferrero et al. (2011a,b)
BZ1, BZ3, BZ6, BZ8, EHS, HMS	SE, SO	MSPD: ξηρό δείγμα 2 g + 1 g C ₁₈ + 1 g Na ₂ SO ₄ . εκχυλίζεται με 2x8 ml οξικού αιθυλεστέρα /μεθανόλη (15 λεπτά έκαστος). Εξατμίζεται σε 0.5 mL, αραιώνεται σε 1 mL.100 μL και παραγωγοποιείται με BSTFA (60 ° C,10 λεπτά).	GC-MS(EI ⁺)	0.07– 0.28	88–105	Sánchez- Brunete et al. (2011)
BZ3, EHS, HMS και άλλες ενώσεις	SO	PLE: δείγμα 1 g (+ 7 g diatomaceous earth) εκχυλίζεται με 2x10 λεπτά οξικό αιθυλεστέρα / μεθανόλη (80 ° C, 120 bar). Εξατμίζεται μέχρι ξηρού, επαναδιαλύεται σε 1 ml οξικού αιθυλεστέρα και παραγωγοποιείται με BSTFA στην είσοδο του GC.	GC-MS/MS(EI ⁺)	0.5–1.7	65–109	Albero et al. (2012a)
EHDP, EHMC, OC	SE	MAE: δείγμα 5 g, εκχυλίζεται με 30mL ακετόνης / επτανίου.(115 ° C, 15 λεπτά) εξατμίζεται μέχρι ξηρού και επαναδιαλύεται σε 1 mL επτάνιο.	GC-MS/MS	1.5–2	97–115	Amine et al. (2012)
BZ3, OC και άλλες ενώσεις	SE	PHWE + SBSE: δείγμα 2g (+ 18g siliceous earth). εκχυλίζεται με 3x5 λεπτά νερό (10% μεθανόλη) (100 ° C. 103,4 bar), οξινίζεται σε pH 2 και μετά υποβάλλεται σε SBSE όπως περιγράφεται για υδατικά δείγματα .	GC-MS(EI ⁺)	0.07–0.3	13–22	Pintado Herrera et al. (2013)

BP3, OC, OD-PABA, BP1, 4HB, 4DHB, 4MBC, EHMC	SE	PLE: δείγμα 1 g (+ 1 g Al ₂ O ₃) με 25mL μεθανόλη. (100 ° C) εξατμίζεται μέχρι ξηρού και επαναδιαλύεται σε 250 μL ακετονιτρίλιο.	LC-MS/MS (ESI ⁺)	0.4-9.9	58-125	Barón et al. (2013)
BZ1, BZ3, BZ8 και άλλες ενώσεις	SE	MAE: δείγμα 4 g, εκχυλισμένο με ακετόνη / μεθανόλη (5% φορμικό οξύ) (150 ° C. 30 λεπτά). Το εκχύλισμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού και αραιώνεται σε 100 mL με νερό. Τότε γίνεται SPE όπως περιγράφεται για υδατικά δείγματα.	GC-MS(EI ⁺)	01-1.4	101-106	Kotnik et al. (2014)
BZ3, EHDP, EHMC, EHS, HMS, IMC, MBC, OC	SE	SLE + DLLME: δείγμα 10 g εκχυλίζεται με 1 × 5 ml και 2x1 mL ακετόνης. Το εκχύλισμα αραιώνεται σε 5 mL με ακετόνη. Τότε 2mL υποβάλλονται σε DLLME με 60 μL χλωροφορμίου και 5 mL νερού (pH 4).	GC-MS(EI ⁺)	0.018- 0.053	80-106	Tarazona et al. (2014)
BZ3, MBC, OC και άλλες ενώσεις	SS	MSPD: δείγμα 0,1 g, εκχυλισμένο με προσροφητικό C ₁₈ . εκλούεται με 6 mL μεθανόλης + 10 mL ακετονιτρίλιο / υδατικό οξαλικό οξύ. Εξατμίζεται μέχρι ξηρού και επαναδιαλύεται σε 1 mL ακετονιτρίλιο / νερό.	LC-MS/ MS(ESI ^{+/-})	0.856- 1.60	54-81	Li et al. (2016a)

Ακρωνύμια: ID: εσωτερική σκόνη, SE: ιζήματα, SO: χώμα, SS: ιλύς καθαρισμού λυμάτων, BSTFA: N, O-δισ (τριμεθυλσιλυλ) τριφθοροακεταμίδιο, DLLME: μικροεκχύλιση διασποράς υγρού-υγρού, LDPE: χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο, LLE: εκχύλιση υγρού-υγρού, MAE: εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα, MSPD: διασπορά στερεάς φάσης του υποστρώματος, MSTFA: N-μεθυλ-N- (τριμεθυλσιλυλ) τριφθοροακεταμίδιο, PHWE: εκχύλιση υπό πίεση ζεστού νερού, PLE: πεπιεσμένη υγρή εκχύλιση, PMALE: πεπιεσμένη υγρή εκχύλιση με τη βοήθεια μεμβράνης, PSA: πρωτοταγής- δευτεροταγής αμίνη, PVP-DVB: πολυβινυλοπυρρολιδόνη-διβινυλοβενζόλιο συμπολυμερές SBSE: εκχύλιση με προσροφητική ράβδο ανάδευσης, SLE: εκχύλιση στερεού υγρού, SPE: εκχύλιση στερεάς φάσης, APPI: φωτοϊονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης, φωτοϊονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης, EI: ιονισμός ηλεκτρονίων, ESI: ιονισμός ηλεκτροπυροκαυσμού, GC: αερία χρωματογραφία, LC: υγρή χρωματογραφία, MS: φασματομετρία μάζας, MS / MS: διαδοχική φασματομετρία μάζας, UV: υπεριώδης φασματομετρία, MLOD: όριο ανίχνευσης μεθόδου

3.3 Αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού αντηλιακών

Ο αναλυτικός προσδιορισμός UV φίλτρων σε περιβαλλοντικά δείγματα ακολουθεί τις βασικές αρχές της ανάλυσης αντηλιακών, ώστε να πληροί τις απαιτήσεις του ποιοτικού ελέγχου των εμπορικών προϊόντων. Έτσι, αναπτύχθηκαν τεχνικές υγρής και αέριας χρωματογραφίας συνδυασμένες με κατάλληλα πρωτόκολλα εκχύλισης - προσυγκέντρωσης, για την ανίχνευσή τους σε διάφορα περιβαλλοντικά υποστρώματα, σε επίπεδα συγκέντρωσης ανά τρισεκατομμύριο (ng L^{-1}). Με τη βοήθεια αυτών των τεχνικών είναι δυνατός ο ταυτόχρονος προσδιορισμός και διαχωρισμός διαφόρων οργανικών φίλτρων UV ακτινοβολίας (A. Chisvert et al, 2010).

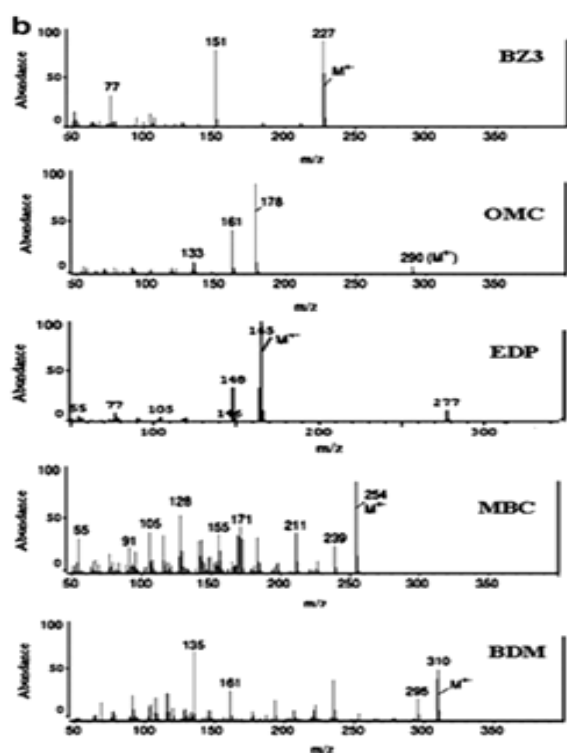
3.3.a. Αέρια Χρωματογραφία (GC)

Η χρήση της αέριας χρωματογραφίας με σκοπό τον διαχωρισμό των ουσιών που απορροφούν υπεριώδη ακτινοβολία, κεντρίζει το ενδιαφέρον με αποτέλεσμα την παρουσίαση αρκετών αναλυτικών μεθόδων. Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου GC είναι τα χαμηλά όρια ανίχνευσης, αλλά σε αντίθεση με τη μέθοδο LC υστερεί, διότι δεν προσδιορίζονται εύκολα τα οργανικά φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας, καθώς οι πιο πολλές ενώσεις είναι θερμικά ασταθείς κ μη πτητικές. Οι μόνες ενώσεις που μπορούν να αναλυθούν απευθείας με GC είναι ορισμένα φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας που έχουν ομάδες υδροξυλίου -OH (π.χ. 3-βενζοφαινόνη, εστέρας του 3,3,5 τριμέθυλοκυκλοεξυλο σαλικυλικού οξέος) όπου εμφανίζουν μικρή πτητικότητα.

Το πρόβλημα αυτό όμως λύνεται με τη βοήθεια της παραγωγοποίησης, όπου καθιστά δυνατή την ανίχνευση των περισσότερων φίλτρων UV, ενώ παράλληλα παρέχει περαιτέρω βελτίωση στα όρια ανίχνευσης. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται πιο συχνά με σκοπό την παραγωγοποίηση τους είναι το N-μέθυλο-N-(τριμεθυλοσίλυλο)-τριφθοροακεταμίδιο (MSTFA).

Για να γίνει διαχωρισμός στην GC, χρησιμοποιείται σχεδόν πάντα στήλη από 5%-διφαινυλο-95%-διμέθυλοπολυσιλοξάνιο ή πολυμερή φαινυλ-αρυλενίου τα οποία ισοδυναμούν με 5%-διφαινυλ-95%-διμεθυλοσιλοξάνιο. Χαρακτηριστικά αυτών των στηλών είναι το υψηλό όριο θερμοκρασίας, ότι είναι αδρανείς, μη-πολικές και προσδίδουν βελτιωμένη αναλογία σήματος/θορύβου για καλύτερη ευαισθησία. (Chisvert et al., 2010).

Η ανάλυση φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας γίνεται με τη χρήση ανιχνευτών όπως ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID) και μάζας (GC-MS). Ο δεύτερος, παρέχει πιο μεγάλη ευαισθησία και καθιστά δυνατή και την ταυτοποίηση των φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας, αντίθετα από την απλή ταυτοποίηση τους μέσω των χρόνων κατακράτησης που γίνεται στην περίπτωση του ανιχνευτή FID (Masse et al., 2001; Ikeda et al., 1990; Ro et al., 1994). Στο Σχήμα 16 που ακολουθεί, απεικονίζεται το φάσμα μάζας ορισμένων φίλτρων που έχουν επιλεγεί. Η ανίχνευση με φασματογράφο μάζας MS, γίνεται με χρήση της μεθόδου παρακολούθησης επιλεγμένου ιόντος στην οποία για κάθε ένωση, εμφανίζονται τρία ή και περισσότερα χαρακτηριστικά θραύσματα ιόντων (m/z).



Σχήμα 16. Φάσμα μάζας ορισμένων φίλτρων UV.

3.3.β. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Αποδόσεως (HPLC)

Η Υγρή Χρωματογραφία μπορεί να μην παρουσιάζει τόσο μεγάλη ευαισθησία όσο άλλες τεχνικές, ωστόσο προτιμάται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας ιδιαίτερα για ανάλυση μη πτητικών ενώσεων, επιτρέποντας αποδοτικούς διαχωρισμούς και μετρήσεις σε μικρό χρονικό διάστημα. Με βάση τον Πίνακα 4, παρατηρείται ότι οι περισσότερες αναλυτικές τεχνικές χρησιμοποιούν στατική φάση με C₁₈, αν και λιγότερο υδρόφοβα υλικά (C₈, C₁₂, φαίνυλο-έξυλο) έχουν επίσης δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Οι πιο πολλές αναλυτικές τεχνικές κάνουν χρήση ανιχνευτών συστοιχίας διόδων (DAD) ή φασματομετρίας μάζας (MS). Οι δεύτεροι, είναι η πιο δημοφιλής μέθοδος ανίχνευσης καθώς προσδίδει βελτιωμένα όρια ανίχνευσης, επιτρέπει την ανάλυση μεγάλου αριθμού αναλυτών ακόμη και παρουσία παρεμποδίσεων, αλλά και τη δυνατότητα ανίχνευσης ισομερών. Αντίθετα, για μικρό αριθμό αναλυτών και για δείγματα με απλό υπόστρωμα, επιλέγονται συνήθως ανιχνευτές υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

Η σύνθεση της κινητής φάσης είναι επίσης σημαντική παράμετρος ώστε να επιτευχθεί αποδοτικός διαχωρισμός τόσο μεταξύ των αναλυτών όσο και από άλλους οργανικούς ρύπους ή συστατικά του δείγματος που είναι πιθανόν να συνυπάρχουν στα πραγματικά δείγματα. Είναι εμφανές, με βάση τον Πίνακα 4, ότι έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο κινητές φάσεις ισοκρατικής όσο και βαθμιδωτής έκλυσης, ανάλογα κυρίως με τον αριθμό των αναλυτών, της προβλεπόμενης εφαρμογής (δηλαδή της ανίχνευση παραπροϊόντων) και της πολυπλοκότητας του υποστρώματος (νερό, χόμα, ιστός ψαριού). Σε απλά υποστρώματα (πχ υδατικά δείγματα) προτιμάται η ισοκρατική έκλυση που αποτελείται από υδρο-οργανικά μίγματα, ενώ σε πιο πολύπλοκα υποστρώματα (λυματολόσπη, λύματα κλπ) προτιμάται η βαθμιδωτή έκλυση. Ανάλογα με την αποτελεσματικότητα της ανάλυσης, ασθενή οργανικά οξέα μπορούν να προστεθούν ως τροποποιητές φάσης, αρκεί οι συγκεντρώσεις τους να μην υπερβαίνουν το 1% (v / v) (Chisvert et al, 2010).

Πίνακας 4. Σύνοψη των συνθηκών της HPLC και των αναλυτικών μεθόδων, με σκοπό τον προσδιορισμό φίλτρων υπερϊόδους ακτινοβολίας σε περιβαλλοντικά δείγματα

Τεχνική ανίχνευσης	Στήλη	Συνθήκες	Αναλύτες	Δείγμα	Εκχύλιση	Αναλυτικά χαρακτηριστικά
LC-UV/DAD	C ₁₈ (250 mm x 4.6 mm, 5 μm)	Ισοκρατική έκλυση ACN:Νερό 80:20	EDP	Νερό πισίνας, θαλασσινό νερό	SPE με στήλες C ₁₈	Linear range: 2–10 μg/L and 10–100 μg/L (LOD= 0.3 μg/L) Rec: 97-101%
LC-MS/MS	C ₁₂ (250 mm x 4.6 mm, 4μm)	Βαθμωτή έκλυση MeOH/Νερό (περιέχει 0.1% φορμικό οξύ)	BZ3	Νερό λίμνης, Νερά αποβλήτων	SPE με στήλες HLB	Linear range: 0.2-100 μg/L Instr. LOD: 0.35 pg Method LOD: 1 ng/L Rec: 68%
LC-UV/DAD	C ₁₈ (25 cm x 4.6 mm, 5 μm)	Ισοκρατική έκλυση ACN:Νερό 80:20 (περιέχει SDS)	BDM, BZ3, EMC, MBC	Θαλασσινό νερό, νερό πισίνας, νερά αποβλήτων	SPE με στήλες C ₁₈	Linear range: 10-200 ng/L LODs: 8-24 ng/L Rec: >95%
LC-UV/DAD	C ₁₈ (25 cm x 4.6 mm, 5 μm)	Ισοκρατική έκλυση ACN:Νερό 80:20 (περιέχει SDS)	BDM, BZ3, EMC, MBC, PBS	Θαλασσινό νερό	Cloud Point Extraction (with Triton X-114)	Linear range: 0.5-50 μg/L LODs: 0.14-1.25 μg/L Rec:>95%
LC-UV/DAD	C ₁₈ (25 cm x 4.6 mm, 5 μm)	Ισοκρατική έκλυση ACN:Νερό (80:20)	BZ3, EMC, MBC, PBS	Νερό πισίνας	Advesicle MSPD	LODs: 0.18-1.10 μg/L Rec: 96-103%
LC-UV/DAD	C ₁₈ (25 cm x 4.6 mm, 5 μm)	Βαθμωτή έκλυση from MeOH/Νερό (1/1, v/v) to 100% MeOH	ET	Λυματολάσπη	Εκχύλιση λυματολάσπης και καθαρισμός γέλης πυριτίου	LOD: 57 μg/Kg
LC-MS/MS	C ₁₈ (1.5 cm x 0.2 mm, 3 μm)	Ισοκρατική έκλυση με MeOH/οξικό οξύ 0.2%				
LC-UV/DAD	C ₁₈ (25 cm x 4.6 mm, 5 μm)	Βαθμωτή έκλυση MeOH/Νερό (1/1, v/v) - MeOH	ET	Νερά αποβλήτων και λυματολάσπη	LLE νερόν αποβλήτων και καθαρισμός γέλης πυριτίου Εκχύλιση λυματολάσπης και καθαρισμός γέλης πυριτίου	LOD: 34 ng/L (wasteΝερό) and 57 μg/Kg (sewage sludge) Rec: 74-75%
LC-MS/MS	C ₁₈ (125 mm x 3 mm)	Βαθμωτή έκλυση MeOH/Νερό (0.05% οξικό οξύ)	BZ3, (Z,E)-EMC, (Z,E)-MBC, OCR	Ιστοί ψαριών	Soxhlet και καθαρισμός με GPC και στήλες Florisil	Linear range: 3-30 μg/L LOD: 3 μg/L (2.4 ng/g in tissue) Rec: 86-108%
LC-MS/MS	C ₁₈ (150 mm x 2.1 mm, 3.5 μm)	Βαθμωτή έκλυση MeOH/Νερό (περιέχουν 5 mM οξικό αμμόνιο)	BDM, BZ3, BZ4, EDP, IMC, MBC, OCR, PBS, PDT	Νερό ποταμού, θαλασσινό νερό, νερά αποβλήτων	SPE with Oasis HLB	Linear range: 5-1000 μg/L LOD: 7-46 ng/L Rec: 29-108%
LC-MS/MS	C ₁₈ (100 mm x 3 mm, 1.7μm)	Βαθμωτή έκλυση MeOH/Νερό (0.5% Acetic	BZ1, BZ2, BZ3, BZ4	Επιφανειακά νερά και νερά	SPE with Oasis MCX στήλες	Linear range: 0-12 μg/L LODs: 0.15-7.0 μg/L

		acid and 5 mM NH ₄ OH)		αποβλήτων		and 0.1-5.0 µg/L Rec: 57-117%
LC-MS/MS	C ₁₈ (150mm x 3.0 mm, 3.5µm)	Βαθμωτή έκλουση ACN/Νερό (περιέχουν 0.1% φορμικό οξύ)	BZ1, BZ2, BZ3, BZ4 and other benzophenones, EDP, (Z,E)-EMC, MBC	Ιστοί ψαριών και παθητικοί δειγματολήπτες	Solvent extraction of fish tissue. Εκχύλιση με τη μορφή SPE των μεμβρανών των παθητικών δειγματοληπτών.	Instr. LODs: = 36-170 pg Method LOD =158-990 ng/ POCIS membrane Method LOD =78-205 ng/g fish tissue
LC-MS/MS	C ₁₈ (150 mm x 2.1 mm, 3.5 µm)	Βαθμωτή έκλουση Νερό/MeOH (περιέχουν 5 mM οξικό αμμώνιο).	BZ4, PBS	Νερό βρύσης, θαλασσινό νερό, νερά αποβλήτων	SPE με στήλες Oasis HLB	Linear range: 5–1500 µg/L LODs: 0.8-30 ng/L
LC-MS/MS	Phenyl-Hexyl (150 mm x 2.0 mm, 3.0 µm)	Βαθμωτή έκλουση Νερό/MeOH (περιέχουν 1mM of TrBA και 1mM οξικό οξύ.	BZ3, EDP, EMC, IMC, MBC, OCR			Rec: 60-132%
LC-MS/MS	C ₈ column (150 mm x 4.6 mm, 5µm)	Βαθμωτή έκλουση MeOH/Νερό	BDM, BZ3, BZ4, EDP, (Z,E)-EMC, ES, (Z,E)-HS, (Z,E)-IMC, (Z,E)-MBC, OCR, PBS BDM, BZ3, EDP, (Z,E)-EMC, ES, (Z,E)-HS, (Z,E)-IMC, (Z,E)-MBC, OCR	Νερά αποβλήτων	SPE με στήλες Oasis HLB	Linear range: 1-10000 µg/L LODs (at optimum ionization mode): 0.5-3.3 µg/L
LC-MS/MS	C ₈ (150 mm x 4.6 mm, 5 µm)	Βαθμωτή έκλουση MeOH/Νερό	BZ1, BZ3, BZ8, EDP, OCR	Νερό λίμνης, νερά αποβλήτων	MALLE	Linear range: 25-2500 ng/L LODs: 0.9-16 ng/L Rec: 60-104%
UHPLC–MS/MS	C ₁₈ (50 mm x 4.6 mm, 1.8µm)	Βαθμωτή έκλουση MeOH/Νερό (με οξικό οξύ pH=3)		Λυματολάσπη	PLE	Linear range: 0.1-500 µg/L LODs: 1.5-3.5 µg/Kg Rec: 30-108%
LC–MS/MS	C ₁₈ (100mm x 2.1mm, 5µm)	Βαθμωτή έκλουση MeOH / Νερό (περιέχουν 5 mM οξικό αμμώνιο)	BZ1, BZ2, BZ3, BZ4, BZ6, BZ8	Νερό ποταμού και νερά αποβλήτων	SPE με στήλες Oasis HLB	Linear range: 5-1000 µg/L LODs: 0.06-9.6 µg/L Rec: 83-105%
LC(APPI)-MS/MS	C ₈ (150mm x 4.6mm, 5µm)	Βαθμωτή έκλουση MeOH/Νερό	BDM, BZ3, DBT, EDP, EMC, ES, ET, HS, IMC, MBC, OCR	Λυματολάσπη	Pressurized MALLLE	Linear range: 10-5000 ng/g LODs: 0.3-25 ng/g Rec: 95-124%
UHPLC–MS/MS	C ₁₈ (50mmx4.6mm, 1.8 µm)	Βαθμωτή έκλουση MeOH/Νερό (οξικό οξύ pH=2.8)	BZ1, BZ3, BZ8, EDP, OCR, PBS	Νερό ποταμού, νερά αποβλήτων	SPE με στήλες Oasis HLB και Bond Elute Plexa	Linear range: 5-5000 ng/L LODs: 1-5 ng/L Rec: 27-97%

LC-UV	C ₁₈ (250 mm x 4.6 mm, 5 μm)	Ισοκρατική έκλουση EtOH:1% οξικό οξύ 70:30 (v/v)	BZ3, IMC, MBC, OCR, EDB, EMC	Νερό ποταμού θαλασσινό νερό, κανάλια άρδευσης, νερό πισίνας	Ionic liquid-based SDME	Linear range: 1-150 μg/L LODs: 0.06-3.0 μg/L Rec: 92-115%
UHPLC- MS/MS	C ₁₈ (50mmx4.6mm, 1.8 μm)	Βαθμωτή έκλουση MeOH/Νερό (οξικό οξύ pH=2.8)	BZ3, BZ8, EDP, OCR	Νερό ποταμού, νερά αποβλήτων	SBSE: PDMS- coated stir bars	Linearity: < 1000 ng/L LODs: 2.5-10 ng/L Rec: 25-89%
LC- UV/DAD	Monolithic C ₁₈ (100 mm x 4.6 mm)	Ισοκρατική έκλουση ACN/100 mM CTAC 65:35 (v/v)	BDM, BZ3, EMC, HS	Θαλασσινό νερό νερό πισίνας	On-line SPE: Oasis HLB sorbent	Linearity: < 160 μg/L LODs: 0.45-3.2 μg/L

Ακρωνύμια: AcEt: οξικός αιθυλεστέρας, ACN:ακετονιτρίλιο, BDM: Βούτυλο-μέθοξυ διβενζόλομεθάνιο, BZ1: 1-βενζοφαινόνη, BZ-2: 2-βενζοφαινόνη, BZ3: 3-βενζοφαινόνη, BZ4: 4-βενζοφαινόνη, BZ6: 6-βενζοφαινόνη, BZ8: 8-βενζοφαινόνη, CTAC: Χλωριούχο κέτυλο τριμεθυλαμμώνιο, DBT: Διαίθυλοέξυλο βουτάμιδο τριαζόνη, EDP: Αίθυλο έξυλο διμεθύλ p-άμινο βενζοϊκό οξύ (PABA), EMC: Αίθυλο έξυλο μεθοξυκιναμικό οξύ, ES: αίθυλο έξυλο σαλικυλικό οξύ, ET: αίθυλο έξυλο τριαζόνη, EtOH:αιθανόλη, GPC: Χρωματογραφία διαπερατότητας πηκτής, HLB: Υδροφιλη-υδρόφοφη ισορροπία προσροφητικού, HS: Homosalate, IMC: Ισοάμυλο μέθοξυ κινναμικό, LLE: Υγρό-υγρό εκχύλιση, LOD: Όριο ανίχνευσης, MALLE: Εκχύλιση υγρού-υγρού με μη-πορώδη μεμβράνη, MBC: 4-μέθυλοβενζυλιδένο καμφορά, MCX: Mixed-mode cation-exchange and reversed-phase sorbent, MDL: Μέθοδος ορίων ανίχνευσης, MeOH: Μεθανόλη, MSPD: Διασπορά στερεάς φάσης του υποστρώματος, OCR: Οκτοκρυλένιο, PBS: Φαίνυλο-βένζιμιδαζόλο σουλφονικό οξύ, PDT: Φαίνυλο διβενζυμιδαζόλο τετρασουλφονικό οξύ (άλας δι-νατρίου), PLE: Εκχύλιση υγρού υπό πίεση, POCIS: Polar organic chemical integrative sampler, Rec: Ανάκτηση, SDB: Συμπολυμερές στυρενίου-διβύνυλοβενζολίου, SDME: Μικροεκχύλιση σταγόνας, SDS: δωδεκύλ-θειικό νάτριο, SPE: Εκχύλιση στερεάς φάσης, TrBA: τρι-n-βουτυλαμίνη, UHPLC: Υγρή Χρωματογραφία Υπερ-υψηλής Αποδόσεως.

Βιβλιογραφία

- Aulakh, J.S., Malik, A.K., Varinder Kaur, Philippe Schmitt-Kopplin, A Review on Solid Phase Microextraction (SPME-HPLC), Analysis of Pesticides, Critical Reviews in Analytical Chemistry, **2005**, 35, 71-85
- Balmer M.E., Buser H.R., Muller M.D., Poiger T., Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss lakes. Environ. Sci. Technol., **2005**, 39, 953–962
- Barker S.A., Matrix solid phase dispersion (MSPD), J. Biochem. Biophys. Methods, **2007**, 70, 151–162
- Benede J.L., Chisvert A., Giokas D.L., Salvador A., Stir bar sorptive-dispersive microextraction by magnetic nanoparticles-nylon 6 composite for the extraction of hydrophilic organic compounds in aqueous media, Anal. Chim. Acta, **2016**, 926, 63-71
- Blough N.V., Zepp R.G., Reactive Oxygen species in natural waters, Structure Energetics and Reactivity in Chemistry Series (Search Series), **1995**, 2, 280-333
- Brausch J.M., Rand G.M., A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity, Chemosphere, **2011**, 82, 1518–1532
- Chisvert A., Giokas D., Benedé J.L., Salvador A., Environmental Monitoring of Cosmetic Ingredients, Editor(s): Salvador A., Chisvert A., Analysis of Cosmetic Products, Elsevier B.V., 2018, Pages 435-540
- Chisvert A., Giokas D.L., Salvador A., Analytical Determination of UV absorbing chemicals in the environment, Household and Personal Care Today, **2010**, 4, 32-37
- Chisvert A., León-González Z., Tarazona I., Salvador A., Giokas D., An overview of the analytical methods for the determination of organic ultraviolet filters in biological fluids and tissues, Anal. Chim. Acta, **2012**, 752, 11–29

- Diaz-Cruz S., Llorca M., Barcelo D., Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment, *Trends in Analytical Chemistry*, **2008**, 27, 873-887
- Giokas D.L., Sakkas V.A., Albanis T.A., Determination of residues of UV filters in natural waters by solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-photodiode array detection and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.*, **2004**, 1026, 289-293
- Giokas D.L., Sakkas V.A., Albanis T.A., Lampropoulou D.A., Determination of UV-filter residues in bathing waters by liquid chromatography UV-diode array and gas chromatography-mass spectrometry after micelle mediated extraction-solvent back extraction, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1077, 19-27
- Giokas D.L., Salvador A., Chisvert A., UV filters: From sunscreens to human body and the environment, *Trends in Analytical Chemistry*, **2007**, 26, 360-374
- Kotnik K., Kosjek T., Krajnc U., Heath E., Trace analysis of benzophenone-derived compounds in surface waters and sediments using solid-phase extraction and microwave-assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2014**, 406, 3179-3190
- Lambropoulou D.A., Giokas D.L., Sakkas V.A., Albanis T.A., Karayannis M.I., Gas chromatographic determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and octyldimethyl-paminobenzoic acid sunscreen agents in swimming pool and bathing waters by solid-phase microextraction, *J. Chromatogr. A*, **2002**, 967, 243-253
- Lores M., Llompart M., Alvarez-Rivera G., Guerra E., Vila M., Celeiro M., Lamas JP., Garcia-Jares C., Positive lists of cosmetic ingredients: Analytical methodology for regulatory and safety controls- A review, *Anal. Chim. Acta*, **2016**, 915, 1-26
- Magi E., Carro M., Scarpolla C., Nguyen K.T., SBSE and LC-MS/MS for Trace Analysis of UV filters in different water matrices, *Chromatographia*, **2012**, 75, 973-982

- Negreira, N., Rodriguez I., Ramil M., Rubi E., Cela R., Sensitive determination of salicylate and benzophenone type UV filters in water samples using SPME. Derivatization and GC tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, **2009**, *638*, 33-44
- Negreira N., Rodríguez I., Rubí E., Cela R., Optimization of pressurized liquid extraction and purification conditions for gas chromatography–mass spectrometry determination of UV filters in sludge, *J. Chromatogr. A*, **2011**, *1218*, 211–217
- Paredes E., Perez S., Rodil R., Quintana J.B., Beiras R., Ecotoxicological evaluation of 4 UV filters using marine organisms from different trophic levels *Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus Lividus* and *Siriella Armata*, *Chemosphere*, **2014**, *104*, 44-50
- Plagellat C., Kupper T., Furrer R., Alencastro L.F., Grandjean D., Tarradellas J., Concentrations and specific loads of UV filters in sewage sludge originating from a monitoring network in Switzerland, *Chemosphere*, **2006**, *62*, 915–925
- Poiger T., Buser H.R., Balmer M.E., Bergquist P.A., Muller M.D., Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes, *Chemosphere*, **2004**, *55*, 951-963
- Ramos S., Homen V., Alves A., Santos L., Advances in analytical methods and occurrence of organic UV filters in the environment, Review, *Science of the total environment*, **2015**, *526*, 278-311
- Ramos S., Homem V., Alves A., Santos L., A review of organic UV-filters in wastewater treatment plants, *Environment International*, **2016**, *86*, 24–44
- Regueiro J., Llompart M., Garcia-Jares C., Garcia-Monteagudo J.C., Cela R., Ultrasound- assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters, *J. Chromatogr. A*, **2008**, *1990*, 27-38
- Rezaee M., Assadi Y., Milani Hosseini M-R., Aghee E., Ahmadi F., Berijani S., Determination of organic compounds in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1116*, 1-9

- Richardson S.D., Ternes T.A., Water analysis: emerging contaminants and current issues, *Anal. Chem.*, **2005**, *77*, 3807–3838
- Rodil L., Moeder M., Development of a method for the determination of UV filters in water samples using SBSE and TD-GC-MS, *J. Chromatogr. A.*, **2008**, *1179*, 81-88
- Rodil, R., Moeder, M., Development of a simultaneous pressurized-liquid extraction and clean-up procedure for the determination of UV filters in sediments, *Anal. Chim. Acta*, **2008b**, *612*, 152-159
- Rodil R., Schrader S., Moeder M., Non-porous membrane-assisted liquid–liquid extraction of UV filter compounds from water samples, *Journal of Chromatography A*, **2009**, *1216* , 4887–4894
- Rodil R., Schrader S., Moeder M., Pressurized membrane-assisted liquid extraction of UV filters from sludge, *J. Chromatogr. A*, **2009**, *1216*, 8851–8858
- Roman I.P., Chisvert A., Canals A., Dispersive solid-phase extraction based on oleic acid-coated magnetic NPs followed by GC-MS/MS for UV filter determination in water samples, *J. Chromatogr. A*, **2011**, *1218*, 2467-2475
- Salvador A., Chisvert A., Sunscreen analysis. A critical survey on UV filters determination. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, *537*, 1-14
- Sanchez-Quiles D., Tovar-Sanchez A., Are sunscreens a new environmental risk associated with coastal tourism?, *Environment International*, **2015**, *83*, 158-170
- Serpone N., Salinaro A., Emeline A.V., Horikoshi S., Hidaka H., Zhao J., An in vitro systematic spectroscopic examination of the photostabilities of a random set of commercial sunscreen lotions and their chemical UVB/UVA active agents, *Photochem. Photobiol*, **2002**, *1*, 970-81
- Subedi B., Du B., Chambliss C.K., Koschorreck J., Rüdell H., Quack M., Brooks B.W., Usenko S., Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in German fish tissue: a national study. *Environ. Sci. Technol.*, **2012**, *46*, 9047–9054

Tarazona I., Chisvert A., Leon Z., Salvador A., Determination of hydroxylated benzophenone UV filters in sea water samples by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **2010**, *1217*, 4771-8

Tarazona I., Chisvert A., Salvador A., Development of a gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of ultraviolet filters in beach sand samples, *Anal. Methods*, **2014**, *6*, 7772-7780

Vidal L., Chisvert A., Canals A., Salvador A., Ionic Liquid-based single-drop microextraction followed by liquid chromatography – ultraviolet spectrophotometry detection to determine typical UV filters in surface water samples, *Talanta*, **2010**, *81*, 549-555

Yang H.Y., Li H.F., Masahito I., Lin J. M., Guo G.S., Ding M.Y., Combination of dynamic hollow fiber liquid-phase microextraction with HPLC analysis for the determination of UV filters in cosmetic products, *Sci. Chem.*, **2011**, *S4*, 1627-1634

Zenker A., Schmutz H., Fent K., Simultaneous trace determination of nine organic UV-absorbing compounds (UV filters) in environmental samples, *J. Chromatogr. A*, **2008**, *1202*, 64–74

Zhang Y., Kee-Lee H., Ionic liquid-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC for the determination of ultraviolet filters in environmental water samples, *Anal. Chim. Acta*, **2012**, *750*, 120-126

Κεφάλαιο 6: Τεχνικές Προκατεργασίας Βιολογικών Δειγμάτων
(https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/3672/1/02_chapter_6.pdf)

Ποιοτική και ποσοτική χημική ανάλυση επιλεγμένων δειγμάτων αιθέριων ελαίων λεβάντας ελληνικής προελεύσεως: αξιολόγηση βάσει των προδιαγραφών της ευρωπαϊκής φαρμακοποιίας, 2017
(<https://pergamos.lib.uoa.gr/uoa/dl/frontend/file/lib/default/data/1333142/theFile>)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



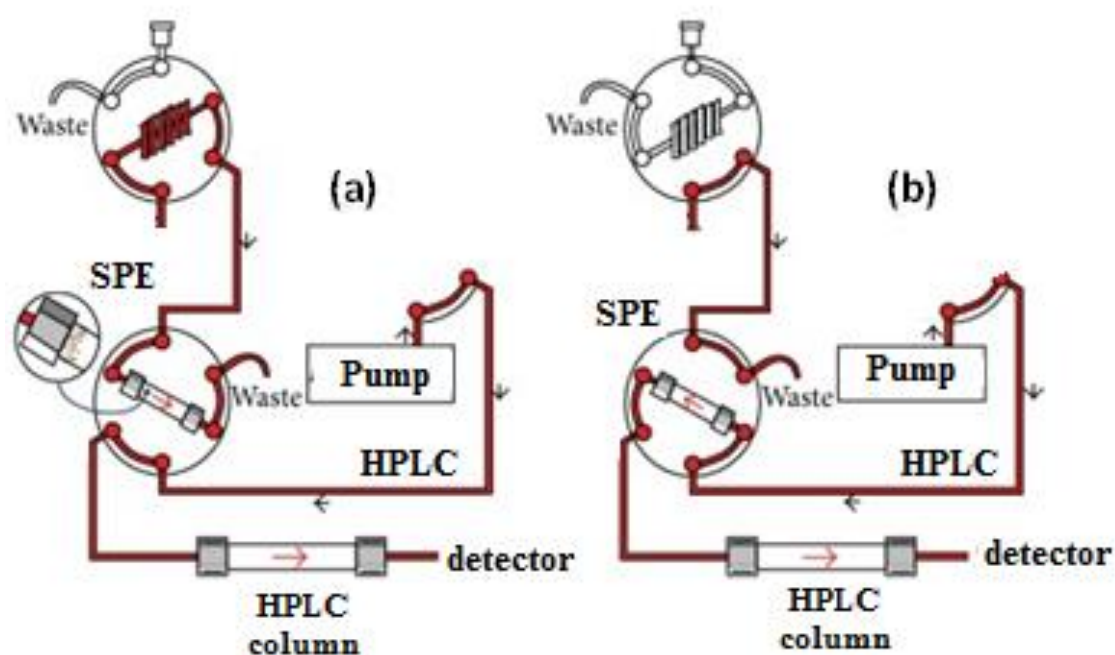
4. Εισαγωγή

Η προκατεργασία του δείγματος (sample preparation) αποτελεί το πιο σημαντικό στάδιο μιας αναλυτικής μεθοδολογίας, καθώς απαιτεί περισσότερο από το 50% του χρόνου που απαιτείται για τη συνολική διαδικασία της ανάλυσης, ενώ παίζει καθοριστικό ρόλο στην αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Ο σκοπός της προκατεργασίας του δείγματος είναι αφενός να διαχωριστούν τα συστατικά της μήτρας του υποστρώματος του δείγματος από τους αναλυτές και αφετέρου να προσυγκεντρωθούν οι αναλύτες, ώστε να είναι εφικτός ο προσδιορισμός τους σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων (όπου αυτό είναι αναγκαίο). Τα στάδια προκατεργασίας του δείγματος περιλαμβάνουν την ομογενοποίηση του δείγματος, την εκχύλιση των αναλυτών και συχνά τον καθαρισμό του εκχυλίσματος από άλλα συστατικά του δείγματος που ενδέχεται να έχουν συν-εκχυλιστεί. Οι συμβατικές τεχνικές εκχύλισης (όπως η εκχύλιση Soxhlet, η SLE, η LLE και η SPE είναι οι πιο δημοφιλείς) (Sánchez-Camargo et al., 2016), απαιτούν τη χρήση μεγάλης ποσότητας υλικών και οργανικών διαλυτών, είναι δαπανηρές και συνήθως αργές, γεγονός που δεν διευκολύνει την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε αναλύσεις ρουτίνας (Song, 2016).

Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στον τομέα της ανάπτυξης και εφαρμογής αυτοματοποιημένων αναλυτικών μεθόδων κατεργασίας των δειγμάτων, με σκοπό τη μείωση της χρήσης διαλυτών, την ταχύτερη ανάλυση, την δυνατότητα ταυτόχρονης κατεργασίας μεγάλου αριθμού δειγμάτων, την εξοικονόμηση πόρων καθώς και την ενεργειακά αποδοτικότερη προκατεργασία των δειγμάτων (Sánchez-Camargo et al, 2016). Η προκατεργασία των δειγμάτων μπορεί να γίνει ξεχωριστά, δηλαδή να ετοιμαστεί ένα δείγμα το οποίο θα αναλυθεί σε άλλη πλατφόρμα. ή αυτοματοποιημένα, δηλαδή να ενσωματωθεί σε μια αναλυτική πλατφόρμα, έτσι ώστε ένα δείγμα να φορτώνεται, να προετοιμάζεται και να αναλύεται σε μια συσκευή.

Η σύζευξη μεθόδων εκχύλισης και ανάλυσης έχει αναφερθεί επιτυχώς σε πολλά συστήματα και με διαφορετικούς ανιχνευτές κυρίως μοριακής και ατομικής φασματοσκοπίας (Θεμελής, 1999). Οι λιγότερες από τις εφαρμογές αυτές όμως αφορούν την εκχύλιση και άμεση σύζευξη με τεχνικές διαχωρισμού, όπως η υγρή χρωματογραφία, για τον ταυτόχρονο διαχωρισμό και ανάλυση πολλών ενώσεων στο ίδιο δείγμα.

Η πιο διαδεδομένη εφαρμογή της αυτοματοποιημένης κατεργασίας δείγματος σε σύζευξη με υγρή χρωματογραφία (HPLC) είναι η εκχύλιση υγρής-στερεάς φάσης σε ροή (On-line SPE). Όλα τα στάδια μιας κλασσικής διαδικασίας εκχύλισης SPE (καθαρισμός στήλης, ενεργοποίηση, εγκλιματισμός, φόρτωση δείγματος και εκχύλιση) πραγματοποιούνται σε αυτοματοποιημένες διατάξεις ροής όπως αυτή του Σχήματος 1. Σε πολλές περιπτώσεις, όλα τα στάδια πραγματοποιούνται προς μια κατεύθυνση, ενώ το στάδιο εκχύλισης πραγματοποιείται με αντιστροφή της ροής του διαλύτη εκχύλισης, ο οποίος οδηγείται και απευθείας προς ανάλυση.

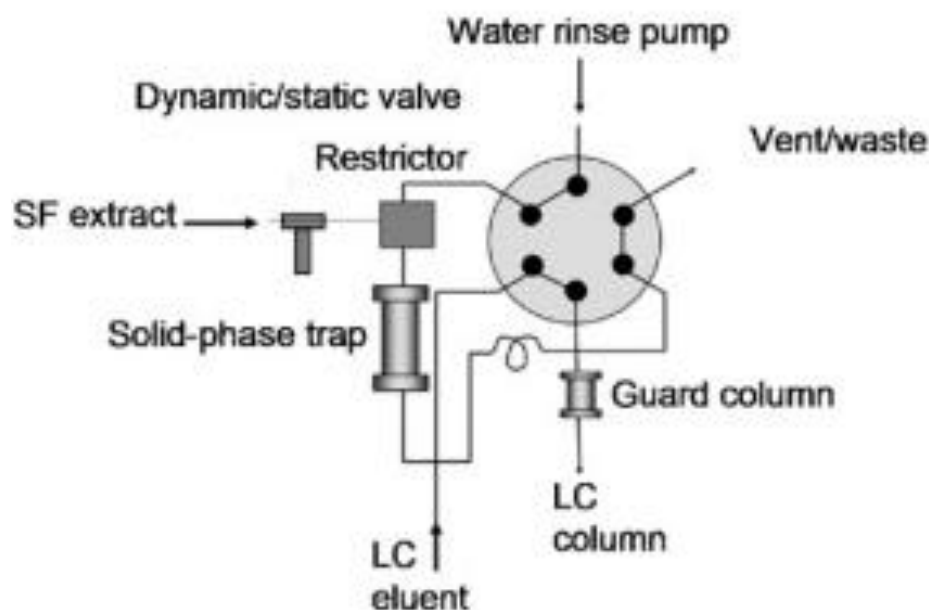


Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση του χρησιμοποιούμενου συστήματος εκχύλισης υγρής-στερεάς φάσης σε ροή (α) Μεταφορά του δείγματος στη στήλη προσυγκέντρωσης SPE. (β) Μεταφορά των αναλυτών που διατηρούνται στη στήλη προσυγκέντρωσης SPE στη χρωματογραφική στήλη (Mazzoni et al., 2015).

Όσον αφορά την κατεργασία στερεών δειγμάτων, αυτοματοποιημένες μέθοδοι εκχύλισης έχουν αναπτυχθεί σχετικά πρόσφατα με την ανάπτυξη μεθόδων όπως η Εκχύλιση Υπερκρίσιμου Υγρού (supercritical fluid extraction- SFE) και η εκχύλιση πεπιεσμένου υγρού, (pressurized fluid extraction-PLE) οι οποίες διαθέτουν παρόμοια χαρακτηριστικά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε on-line σύνδεση με υγρή χρωματογραφία (LC). Στις μεθόδους αυτές, οι εκχυλίσεις πραγματοποιούνται

συνήθως ως εξής: το δείγμα τοποθετείται σε ένα μικρό δοχείο μέσω του οποίου ρέει ο διαλύτης εκχύλισης. Μετά την εκχύλιση, ο διαλύτης οδηγείται στο σύστημα HPLC για διαχωρισμό των επιμέρους συστατικών και ανάλυση. Σε ορισμένες περιπτώσεις τοποθετείται μια παγίδα διασύνδεσης (π.χ., μεμβράνη) η οποία χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό του δείγματος (Hyötyläinen, T., 2007).

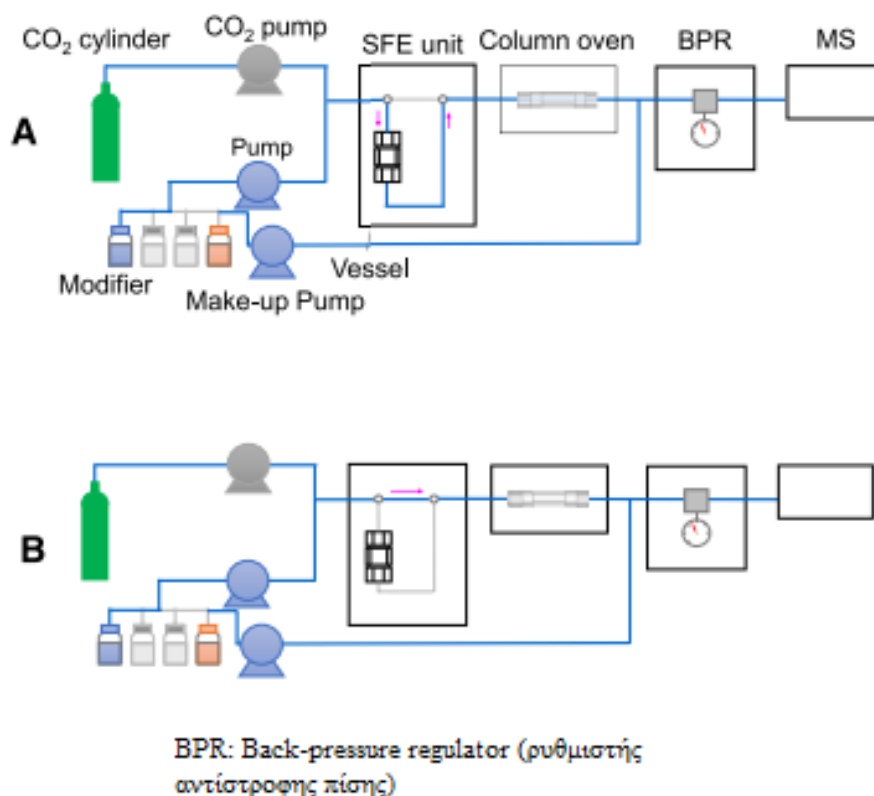
Η πρώτη μέθοδος αυτοματοποιημένης εκχύλισης στερεών δειγμάτων επιτεύχθηκε με σύζευξη της εκχύλισης SFE με LC (Σχήμα 2), η οποία βασίστηκε στην εκχύλιση των αναλυτών από το στερεό δείγμα με την χρήση του υπερκρίσιμου υγρού και στη συνέχεια παγίδευση των αναλυτών (που περιέχονται στο υπερκρίσιμο υγρό) σε στερεό προσροφητικό υλικό. Συγκεκριμένα, ο διαλύτης εκχύλισης (συνήθως CO₂ και CH₃OH) μετά την εκχύλιση του δείγματος, οδηγείται σε στήλη που συνήθως αποτελείται από C₁₈-τροποποιημένο διοξείδιο του πυριτίου ή πορώδες γραφίτη (άνθρακα) (Hyötyläinen, 2007) και στην οποία εγκλωβίζονται οι αναλύτες, με βάση τις αρχές της SPE. Μετά την παγίδευση στην στήλη, οι αναλύτες εκκλύονται και προσδιορίζονται χρωματογραφικά.



Σχήμα 2. On-line σύζευξη SFE και LC με μια παγίδα στερεάς φάσης.

Η ίδια διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί και με πλήρη αυτοματοποίηση μέσω απευθείας διασύνδεσης του δοχείου εκχύλισης (extraction vessel) με την χρωματογραφική στήλη. Στην μέθοδο αυτή, οι διαλύτες εκχύλισης οδηγούνται στην χρωματογραφική στήλη διαμέσου του δοχείου εκχύλισης για συγκεκριμένο χρόνο (Σχήμα 3-Διάγραμμα Α). Κατά την διαδικασία αυτή,

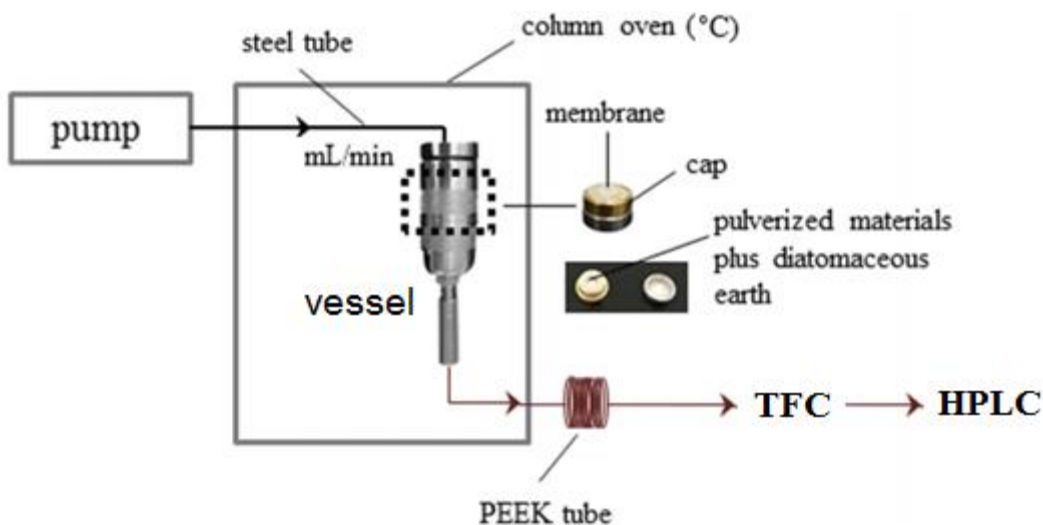
επιτυγχάνεται η εκχύλιση των αναλυτών από το στερεό δείγμα. Στη συνέχεια, μέσω μιας βαλβίδας, απομονώνεται το δοχείο εκχύλισης, οπότε οι διαλύτες χρησιμοποιούνται πλέον ως διαλύτες έκλουσης και οδηγούνται απευθείας στην χρωματογραφική στήλη για διαχωρισμό των αναλυτών (Σχήμα 3-Διάγραμμα Β). (Zoccali et al, 2017).



Σχήμα 3. Σχέδιο του συστήματος: (Α) Λειτουργία εκχύλισης, (Β) Λειτουργία ανάλυσης

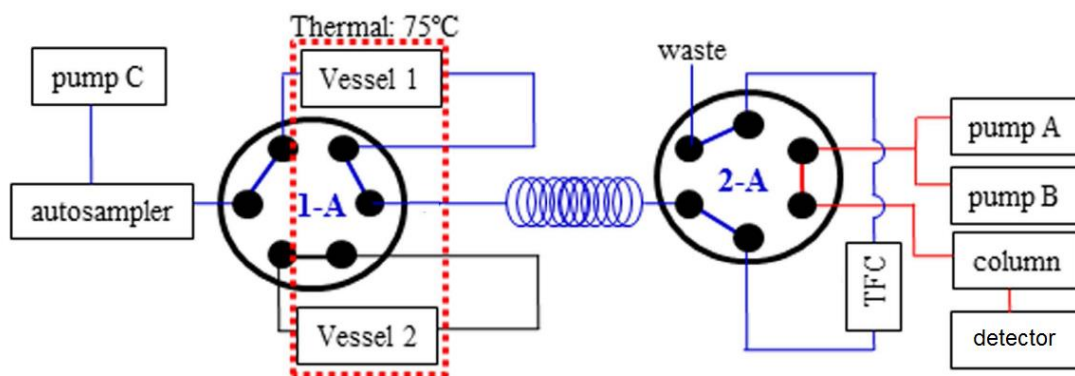
Μια άλλη μεθοδολογία εκχύλισης στερεών σε σύζευξη με υγρή χρωματογραφία είναι η PLE. Η σύζευξη της PLE συνήθως απαιτεί κατάλληλο εξοπλισμό ανάλογα με την περίπτωση και ένα αδρανές αέριο, όπως το άζωτο, που χρησιμοποιείται για να παράγει την πίεση που απαιτείται για την επιτάχυνση της διεργασίας εκχύλισης. Μια μονάδα αυτοματοποιημένης εκχύλισης και ανάλυσης PLE-LC, (Σχήμα 4) περιλαμβάνει μια αντλία διαλυτών, έναν φούρνο, μια στήλη εκχύλισης με την αντίστοιχη υποδοχή (δοχείο εκχύλισης), ένα χαλύβδινο σωλήνα σύνδεσης της αντλίας με το δοχείο εκχύλισης και ένα μακρύ σωλήνα PEEK για τη σύνδεση της μονάδας PLE με την διάταξη HPLC. Ως διαλύτες εκχύλισης χρησιμοποιούνται διάφοροι οργανικοί διαλύτες ανάλογα με την πολικότητα των υπό εκχύλιση αναλυτών, ακόμα και ζεστό νερό, για την εκχύλιση ημιπολικών

συστατικών. Ο διαλύτης διέρχεται μέσω του φυσιγγίου συγκράτησης του δείγματος με συγκεκριμένη ροή και για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα υπό θέρμανση εντός του φούρνου.



Σχήμα 4. Σχηματικό διάγραμμα της on-line PLE-LC.

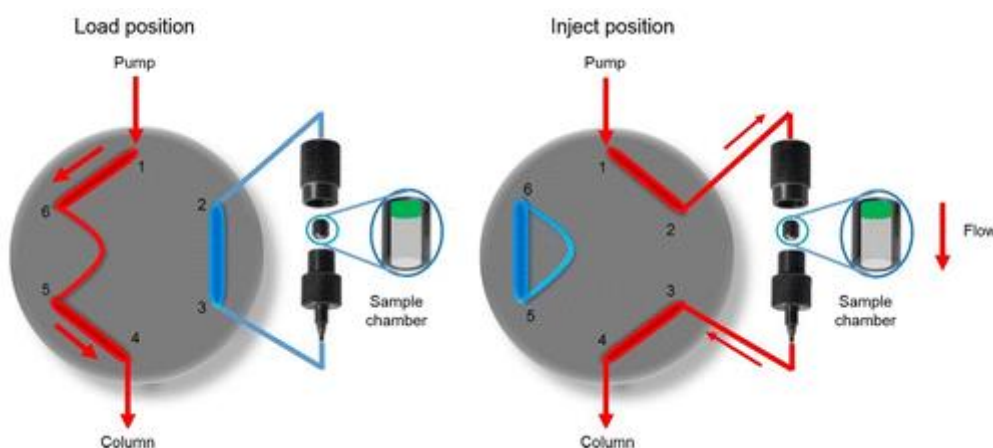
Το υγρό από τη μονάδα PLE συλλέγεται και συμπυκνώνεται μέσω μιας παραλλαγής της SPE, που ονομάζεται χρωματογραφία τυρβώδους ροής (turbulent flow chromatography-TFC). Οι αναλύτες εκλύονται από την στήλη TFC με χρήση κατάλληλου οργανικού διαλύτη συμβατού με την ανάλυση με HPLC που ακολουθεί. Ο διαλύτης αυτός εγχέεται απευθείας στο σύστημα της HPLC για διαχωρισμό και ανάλυση (Song, 2016). Η συνολική διάταξη αναπαρίσταται στο Σχήμα 5.



Σχήμα 5. Διαγραμματική απεικόνιση της λειτουργίας μιας διάταξης PLE-LC.

Μια παραλλαγή των μεθόδων SFE-LC και PLE-LC που αναπτύχθηκε πρόσφατα είναι η εκχύλιση σε ροή υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (Online Extraction Coupled to Liquid Chromatography Analysis - OLE-LC). Στην μέθοδο αυτή, η εκχύλιση πραγματοποιείται εντός της διάταξης της HPLC χωρίς την ανάγκη για αντλίες, βαλβίδες και πρόσθετες διατάξεις. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας την υπάρχουσα βαλβίδα έγχυσης του δείγματος, αντικαθιστώντας τον βρόγχο εισαγωγής του δείγματος με μία στήλη εκχύλισης στην οποία τοποθετείται το δείγμα. Όσο η βαλβίδα έγχυσης του δείγματος παραμένει κλειστή (θέση Load), η κινητή φάση κατευθύνεται απευθείας στην χρωματογραφική στήλη, παρακάμπτοντας την στήλη εκχύλισης. Όταν η βαλβίδα έγχυσης του δείγματος μετακινηθεί στην θέση inject, τότε η κινητή φάση ρέει μέσα από την στήλη εκχύλισης που περιέχει το δείγμα, εκχυλίζοντας τους αναλύτες και τους οδηγεί απευθείας στην χρωματογραφική στήλη για διαχωρισμό των αναλυτών. Μόλις ολοκληρωθεί η εκχύλιση (ή όποτε θελήσει ο χρήστης να σταματήσει την εκχύλιση του δείγματος), η βαλβίδα επιστρέφει στην αρχική θέση "load". (Ferreira et al, 2016)

Η αρχή λειτουργίας της OLE-LC παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα:



Σχήμα 6. Τοποθέτηση της 6 θυρών, 2 θέσεων βαλβίδας που χρησιμοποιείται για την online εκχύλιση (θέσεις "load" και "inject").

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε στην ποιοτική ανάλυση φρέσκων φυτικών ιστών (φύλλα, κορμούς και σπόρους), αποφεύγοντας τα βήματα της ξήρανσης, αλέσματος και ομογενοποίησης, προσυγκέντρωσης, αραιώσης και διήθησης των δειγμάτων. Υπό την έννοια αυτή, η μέθοδος ακολουθεί πολλές από τις οδηγίες των

μεθόδων Πράσινης Χημείας και μπορεί να εφαρμοστεί για τον ποιοτικό έλεγχο φυτικών δειγμάτων, καθώς και για μη-στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση.

Στην παρούσα διατριβή η μέθοδος OLE-LC επεκτάθηκε στην εκχύλιση πολύπλοκων δειγμάτων, όπως εδαφών και ιζημάτων για την ανάλυση μη-πολικών οργανικών ρυπαντών και συγκεκριμένα για την ανάλυση φίλτρων UV ακτινοβολίας (αντηλιακών). Δείγματα εδάφους και ιζημάτων που εμβολιάστηκαν με αντηλιακές ενώσεις εκχυλίστηκαν με OLE και αναλύθηκαν με HPLC με ανιχνευτή UV. Επιπροσθέτως αναπτύχθηκε μια μεθοδολογία για την ποσοτική ανάλυση των αντηλιακών, επεκτείνοντας τις δυνατότητες της μεθόδου και στην πραγματοποίηση ποσοτικών ή ημι-ποσοτικών αναλύσεων. Μια τέτοια μέθοδος, λόγω της απλότητας και της ταχύτητας της, μπορεί να εφαρμοστεί για την άμεση ανάλυση δειγμάτων χωρίς την ανάγκη χρονοβόρων διαδικασιών εκχύλισης, να απλουστεύσει τις αναλύσεις ρουτίνας, να μειώσει το κόστος ανάλυσης και κυρίως να χρησιμοποιηθεί για μια ταχεία ανάλυση των δειγμάτων πριν αποφασιστεί η ανάγκη για περαιτέρω ανάλυση με εξειδικευμένες τεχνικές ανάλυσης και μεθόδους εκχύλισης.

5. Αντιδραστήρια και μέθοδοι

5.1 Αντιδραστήρια

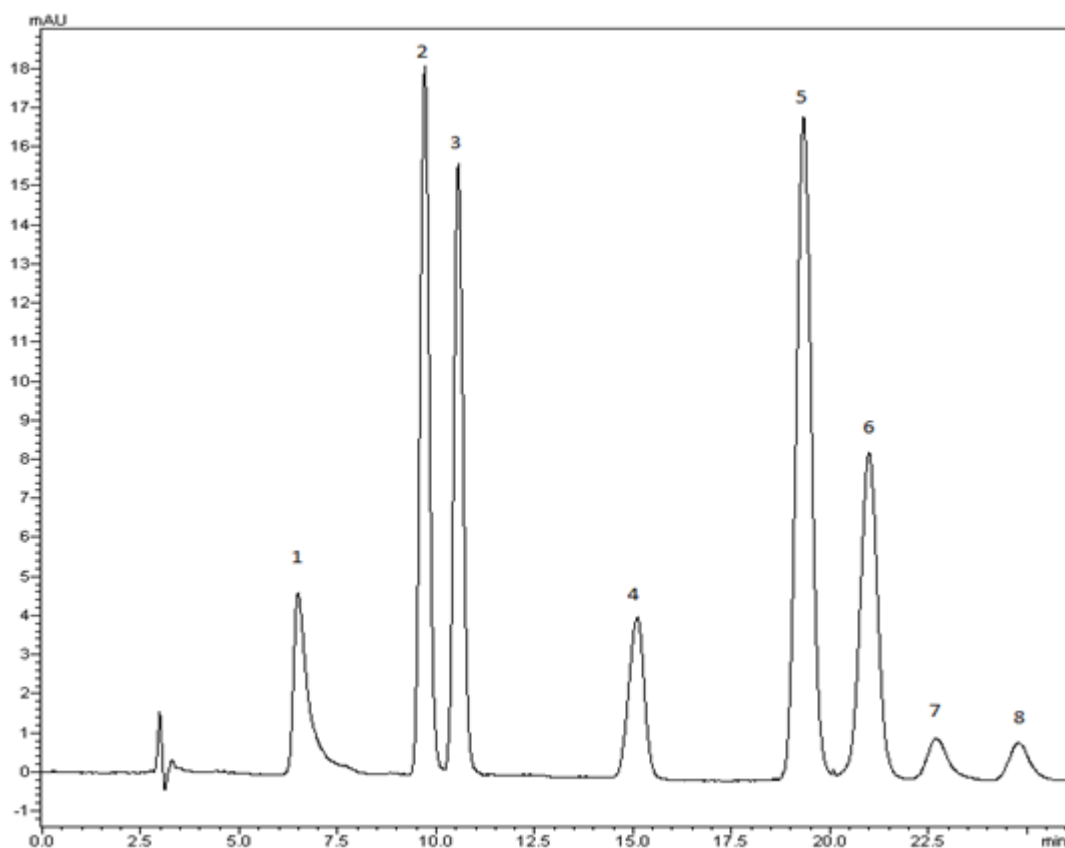
Τα 2-αίθυλο-έξυλο σαλικυλικό οξύ (ES), 2-αίθυλο-έξυλο 4-(διμεθυλ-άμινο) βενζοϊκό (αίθυλ-έξυλ διμεθυλ PABA) (EDP), ισοάμυλο 4-μεθοξυκινναμικό (IMC), βενζοφαινονη-3 (BZ3), 2-αίθυλεξύλ 2-κυάνο-3,3-διφαινυλακρυλικό (οκτοκρυλένιο, OCR), κιτρικό νάτριο και τρις(υδροξυμεθυλ)αμινομεθάνιο αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Γερμανία). Από την Merck (Darmstadt, Γερμανία) προμηθευτήκαμε τα 2-αιθυλεξυλ 4-μεθοξυκινναμικό (EMC), 3-(4-μεθυλοβενζιλιδένιο) καμφορά (MBC), 3,3,5-τριμέθυλοκυκλοξέξυλο σαλικυλικό οξύ (homosalate (HS)), οξικό νάτριο, οξικό οξύ και καυστικό νάτριο. Το υδροχλωρικό οξύ αγοράστηκε από την Fluka (Buchs, Ελβετία), ενώ το κιτρικό οξύ από την Carlo Erba (Milan, Ιταλία). Πρότυπα διαλύματα των 8 αντηλιακών (BZ3, IMC, MBC, OCR, EDP, EMC, ES, HS) συγκέντρωσης 1000 mg L⁻¹ παρασκευάστηκαν σε μεθανόλη. Από αυτά παρασκευάστηκε (με αραιώσεις σε μεθανόλη) πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 2,5 mg L⁻¹ ως προς κάθε αντηλιακό. Όλα

τα πρότυπα διαλύματα διατηρήθηκαν στο ψυγείο στους 4 °C. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την HPLC (μεθανόλη, αιθανόλη, νερό, 2-προπανόλη και ακετονιτρίλιο) αγοράστηκαν από την Fischer Scientific (Loughborough, UK). Το LiChroprep-RP-18 (40-63 μm) δοκιμάστηκε ως πληρωτικό υλικό της στήλης εκχύλισης.

5.2 Εξοπλισμός

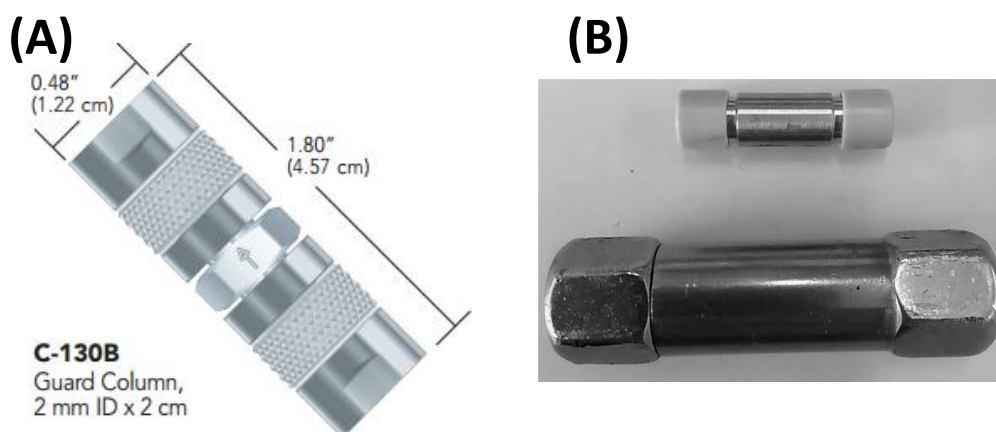
Χρησιμοποιήθηκε σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας (LC) της εταιρείας Shimadzu αποτελούμενο από αντλία υψηλής πίεσης (LC-10AD), βαλβίδα έγχυσης δείγματος Rheodyne με βρόγχο έγχυσης δείγματος 20 μL, ανιχνευτή UV/Vis (SPD-10AV) και φούρνο θερμοστάτησης στηλών (CTO-10A). Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των UV φίλτρων έγινε με ισοκρατική έκλυση με μεθανόλη-νερό 75:25 (v/v) με ταχύτητα ροής 1.0 ml min⁻¹ σε θερμοκρασία 40°C.

Ένα τυπικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος UV φίλτρων συγκέντρωσης 2,5 mg L⁻¹ παρουσιάζεται στο Σχήμα 7.



Σχήμα 7. Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος UV φίλτρων συγκέντρωσης 2,5 mg/L στα 285 nm. 1: BZ3, 2: IMC, 3: MBC, 4: OCR, 5: EDP, 6: EMC, 7: ES, 8: HS.

Ως στήλη εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε προστήλη UPCHURCH C-130B (2.0 mm ID, μήκος 2 cm) που περιείχε δυο φίλτρα (frits) κατασκευασμένα από ανοξείδωτο ατσάλι, με διάμετρο πόρων 2 μm στην είσοδο και την έξοδο (Σχήμα 8A). Λόγω των μικρών της διαστάσεων η στήλη αυτή προκαλεί ελάχιστη αύξηση της πίεσης και ανεπαίσθητη απώλεια του αριθμού των θεωρητικών πλακών (όταν χρησιμοποιείται ως προ-στήλη χρωματογραφίας, και σε συνδυασμό με αναλυτικής στήλες χρωματογραφίας με εσωτερική διάμετρο >3 mm). Ως προστήλη χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκε η Supelguard Ascentis C₁₈ (2cm x 4.0mm, 3 μm) από την Supelco (Σχήμα 8B).



Σχήμα 8. A) Στήλη εκχύλισης UPCHURCH C-130B B) Προστήλη χρωματογραφίας Supelguard Ascentis C₁₈.

5.3 Δείγματα

Συλλέχθηκαν δείγματα εδαφών (καστανόχωμα από την περιοχή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων) και ιζημάτων (από τον ποταμό Λούρο στις περιοχές Πηγές, Βίκι, εκβολές και Αμβρακικός) τα όποια ξηράθηκαν σε συνθήκες περιβάλλοντος και στη συνέχεια κοσκινίστηκαν από κόσκινο διαμέτρου $63\mu\text{m}$. Το κλάσμα το οποίο συλλέχθηκε κοσκινίστηκε ξανά από κόσκινο διαμέτρου $30\mu\text{m}$. Το κλάσμα με μέγεθος κόκκων μεγαλύτερο από $30\mu\text{m}$ ($30\mu\text{m} < x < 63\mu\text{m}$) χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα, ώστε να διασφαλιστεί ότι το δείγμα έχει επαρκώς μεγάλο μέγεθος και δεν θα διαπεράσει τα φίλτρα (frits) μεγέθους $2\mu\text{m}$ της

στήλης εκχύλισης (αν και οποιοδήποτε μέγεθος κόκκων μεγαλύτερο από 2 μm μπορεί να χρησιμοποιηθεί).

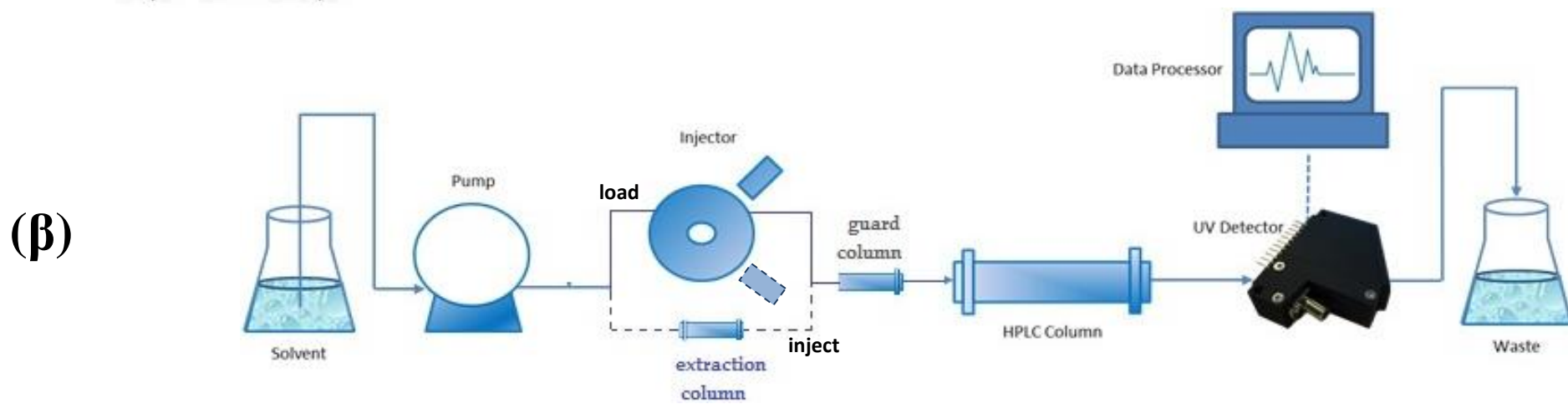
Σε 2 gr χώματος προσθέσαμε 5ml πρότυπου διαλύματος φίλτρων UV και το αφήσαμε να ξεραθεί για 2 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου απουσία φωτός ώστε να παρασκευάσουμε εμβολιασμένα χώματα με συγκεντρώσεις φίλτρων UV από 0.25 έως 25 μg/g. Κατά τη διάρκεια της ξήρανσης το δείγμα ομογενοποιούνταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα με χρήση μεταλλικής σπάτουλας. Το εμβολιασμένο δείγμα που ελήφθησε χρησιμοποιήθηκε χωρίς άλλη κατεργασία.

Μη εμβολιασμένο χόμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των φυσικοχημικών του ιδιοτήτων και συγκεκριμένα για τον προσδιορισμό: οργανικής ύλης (ως απώλεια βάρους μετά από καύση στους 550 °C μέχρι σταθερού βάρους), pH (μετρούμενο με ηλεκτρόδιο υάλου σε αναλογία χώματος: νερού 1:2.5) και ανθρακικών (μετά από πύρωση τους δείγματος στους 990 °C μέχρι σταθερού βάρους).

5.4 Διαδικασία εκχύλισης και ανάλυσης

Ποσότητα 30 mg του δείγματος, τοποθετήθηκε στην στήλη εκχύλισης με χρήση χωνιού, η στήλη σφραγίστηκε και τοποθετήθηκε στην βαλβίδα έγχυσης του δείγματος στη θέση του βρόγχου εισαγωγής δείγματος. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε δυο φορές για κάθε δείγμα, μετακινώντας την βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην θέση Inject για 2 λεπτά. Κατά την διαδικασία της πρώτης εκχύλισης η πίεση του συστήματος πέφτει απότομα κατά 30 bar περίπου, εξαιτίας του κενού όγκου (dead or void volume) της στήλης εκχύλισης η οποία είναι κενή από διαλύτη και σταδιακά επανέρχεται στην αρχική πίεση. Αντίθετα, κατά τη διαδικασία της δεύτερης εκχύλισης η πτώση της πίεσης ήταν ανεπαίσθητη καθώς η στήλη εκχύλισης περιείχε ήδη διαλύτη από την πρώτη εκχύλιση.

Μετά από κάθε εκχύλιση η βαλβίδα επανερχόταν στην αρχική θέση (load) για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό και την ανάλυση των αντηλιακών. Κατά την διάρκεια της δεύτερης ανάλυσης, η στήλη εκχύλισης απομακρύνθηκε από το σύστημα ώστε να εισαχθεί το επόμενο δείγμα προς ανάλυση και να μειωθεί ο χρόνος ανάλυσης μεταξύ διαδοχικών δειγμάτων. Η όλη διαδικασία αναπαρίστανται γραφικά στο Σχήμα 9.



Σχήμα 9. Διαγραμματική απεικόνιση (α) της διαδικασίας εκχύλισης με OLE (β) του συστήματος OLE-LC με ανιχνευτή UV.

6. Αποτελέσματα και συζήτηση

Η κύρια υπόθεση στην οποία στηρίζεται η OLE-LC είναι πως η υψηλή πίεση και η ροή του διαλύτη, μπορούν να εκχυλίσουν τους αναλύτες-στόχους από το δείγμα του υποστρώματος και να γίνει έκλυση τους προς τη χρωματογραφική στήλη για διαχωρισμό και ανάλυση. Σύμφωνα με τον πρώτο νόμο διάχυσης του Fick, (Richter et.al., 1996) η εισαγωγή νέου διαλύτη αναμένεται να βελτιώσει τη μεταφορά μάζας μεταξύ του διαλύματος του διαλύτη (δηλαδή στην προκειμένη περίπτωση της κινητής φάσης) και του στερεού του υποστρώματος, ως εκ τούτου, τον βαθμό εκχύλισης. Η υψηλή πίεση μπορεί επίσης να διευκολύνει την περαιτέρω εκχύλιση των αναλυτών που παγιδεύονται μέσα στους πόρους του υποστρώματος, βοηθώντας αφενός να διαλυτοποιηθούν τυχόν φυσαλίδες αέρα (Richter et.al., 1996) και αφετέρου αναγκάζοντας την κινητή φάση να εισέλθει στους πόρους του στερεού υποστρώματος, όπου κανονικά δεν θα έρχονταν σε επαφή με τους διαλύτες σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (C.Turner et.al., 2013). Αυτές οι αρχές εφαρμόζονται σε όλες τις μεθόδους παρασκευής δειγμάτων που χρησιμοποιούν διαλύτες υπό πίεση ως μέσο εκχύλισης, όπως η PLE / ASE. Η κύρια διαφορά αυτών των μεθόδων με την OLE-LC είναι πως τα στάδια εκχύλισης και χρωματογραφικού διαχωρισμού πραγματοποιούνται στη ροή του συστήματος υγρής χρωματογραφίας, μειώνοντας έτσι τον αριθμό των σταδίων εκχύλισης και τον συνολικό χρόνο ανάλυσης. Ως εκ τούτου, τροποποίηση των πειραματικών συνθηκών μπορεί να επηρεάσει τόσο την εκχύλιση, όσο και τη χρωματογραφική ανάλυση. Για να βελτιστοποιηθεί η εκχύλιση των φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας από το στερεό υπόστρωμα, μελετήθηκε η επίδραση της πίεσης, της θερμοκρασίας, του pH του διαλύτη, της ποσότητας του δείγματος και του χρόνου εκχύλισης. Οι τρεις πρώτες παράμετροι μπορεί να επηρεάσουν τόσο τα στάδια της εκχύλισης όσο και του διαχωρισμού, ενώ οι δύο τελευταίες σχετίζονται μόνο με το στάδιο της εκχύλισης. Όλα τα αποτελέσματα είναι το άθροισμα δύο εκχυλίσεων του ίδιου δείγματος και είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά).

6.1 Μέγεθος σωματιδίων δείγματος

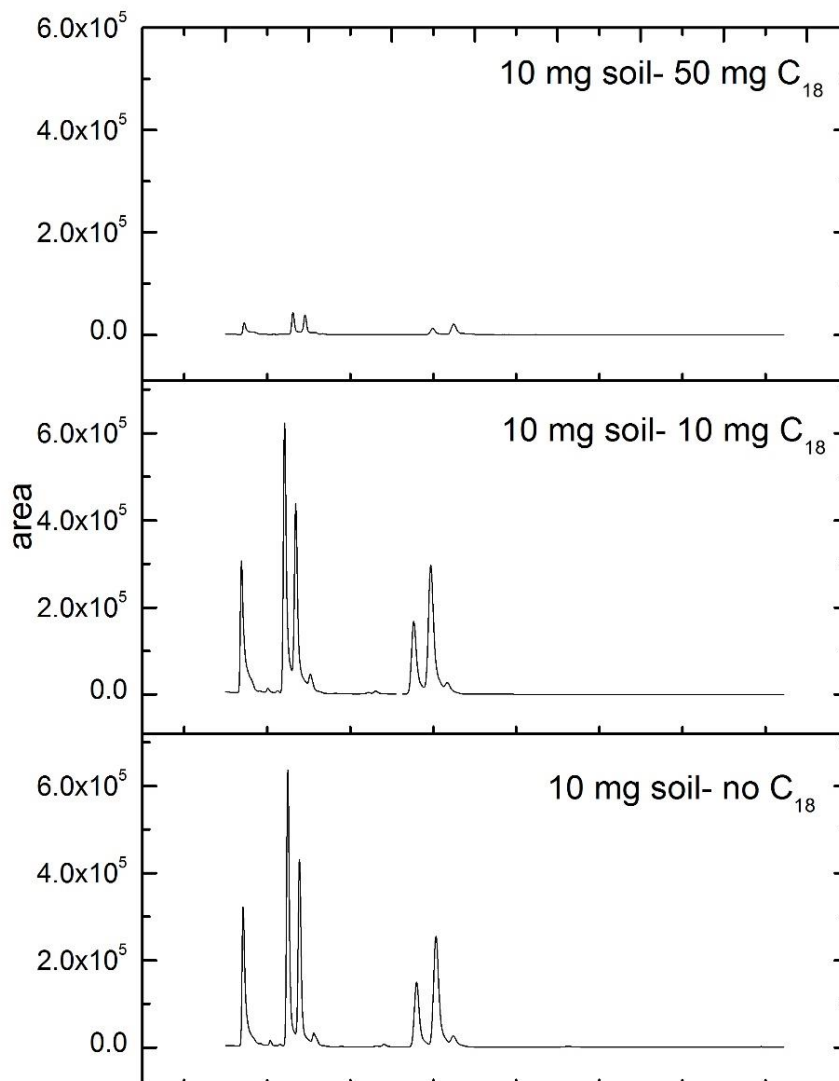
Για να γίνει αποτελεσματικά η εκχύλιση των οργανικών αναλυτών από το στερεό δείγμα, ο διαλύτης πρέπει να μπορεί να διαχέεται μέσα στο δείγμα του υποστρώματος και να διαλυτοποιεί τους αναλύτες (C.Turner et.al., 2013). Όσο μεγαλύτερη είναι η επιφάνεια ανά μονάδα μάζας του δείγματος που μπορεί να εκτεθεί στον διαλύτη, τόσο ταχύτερη και αποτελεσματικότερη θα είναι η εκχύλιση (B.E. Richter et.al., 2012). Για τον λόγο αυτό μελετήθηκε η επίδραση του μεγέθους των σωματιδίων του δείγματος στην αποδοτικότητα της εκχύλισης, χρησιμοποιώντας διαφορετικά κλάσματα μεγέθους σωματιδίων (0,5 mm, 250 μm, 125 μm και <63 μm). Όλα τα δείγματα κοσκινίστηκαν από κόσκινο διαμέτρου οπών 30 μm, για να εξασφαλιστεί πως δεν θα υπάρχουν πολύ μικρά σωματίδια στο δείγμα, που θα μπορούσαν να διαφύγουν από τα φίλτρα (first) της στήλης εκχύλισης αποφράσσοντας τη στήλη LC. Όπως ήταν αναμενόμενο, όσο μικρότερο ήταν το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος (δηλ. όσο μεγαλύτερο ήταν το εμβαδόν της επιφάνειας του δείγματος) τόσο υψηλότερες κορυφές λαμβάνονταν. Επομένως, όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με κλάσματα εδάφους μεταξύ 30-63 μm.

6.2 Επίδραση της προσθήκης πληρωτικού υλικού

Ένας ακόμη παράγοντας που μελετήθηκε, ήταν η προσθήκη του C₁₈ ως μέσου διασποράς αλλά και καθαριστικού μέσου εντός της στήλης εκχύλισης. Συνήθως στις εκχυλίσεις που βασίζονται στην εφαρμογή πίεσης, προστίθεται ένα πληρωτικό υλικό ως μέσο διασποράς για να εξασφαλιστεί η ομοιόμορφη κατανομή του δείγματος εντός της στήλης εκχύλισης και να αποφευχθεί η συσσωμάτωση των σωματιδίων του δείγματος. Στην OLE-LC, καθώς η βαλβίδα μετατοπίζεται στη θέση έγχυσης και το μίγμα διαλυτών έκλουσης γεμίζει τη στήλη εκχύλισης, τα σωματίδια του δείγματος θα κατευθυνθούν προς την έξοδο της στήλης εκχύλισης και θα συγκρατηθούν από το φίλτρο. Καθώς η πίεση μέσα στη στήλη εκχύλισης αυξάνεται, τα σωματίδια υπόκεινται σε «μηχανικό σοκ» που μπορεί να προκαλέσει τη διάτμηση των σωματιδίων του δείγματος, σχηματίζοντας σωματίδια μικρότερου μεγέθους που θα μπορούσαν να συσσωματωθούν στο φίλτρο εξόδου της στήλης εκχύλισης (www.chromacademy.com). Επομένως, εξετάστηκε η επίδραση της προσθήκης C₁₈ (40-60μm) στη στήλη εκχύλισης με σκοπό να υποβοηθηθεί η ομοιόμορφη κατανομή

των σωματιδίων του δείγματος μέσα στη στήλη και να αποφευχθεί ή να μειωθεί η συσσωμάτωση τους. Το πακετάρισμα της στήλης εκχύλισης με C₁₈ ελαττώνει επίσης και τον κενό όγκο της στήλης εκχύλισης (Hanna Giergielewiecz-Możajska et.al., 2001) μειώνοντας έτσι την πτώση της πίεσης κατά την το στάδιο της εκχύλισης, ενώ λόγω των ιδιοτήτων του θα μπορούσε να ενεργήσει και ως καθαριστικός παράγοντας, αφαιρώντας κάποιες από τις προσμίξεις του εδάφους που συν-εκκλούνται κατά τη διάρκεια της εκχύλισης.

Τα αποτελέσματα του Σχήματος 10 αποκαλύπτουν ότι μια μικρή ποσότητα πληρωτικού υλικού σε αναλογία εδάφους: C₁₈ ίση με 1:1, δεν επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης, αλλά η διαχωριστική ικανότητα χειροτερεύει ελαφρώς, ενδεχομένως λόγω του χαλαρού πακεταρίσματος του υλικού C₁₈. Όταν η ποσότητα C₁₈ αυξήθηκε σε πενταπλάσια περίσσεια (δηλ. 50 mg), σε σύγκριση με εκείνη του δείγματος (δηλ. 10 mg), η απόδοση της εκχύλισης μειώθηκε δραματικά. Αυτή η παρατήρηση είναι πιθανόν να σχετίζεται με την ισχυρή προσρόφηση των αναλυτών που εκχυλίστηκαν από το χώμα πάνω στο C₁₈, ως συνέπεια της ασυνεχούς ροής της κινητής φάσης στη στήλη εκχύλισης. Σε αντίθεση με την κλασσική χρωματογραφική ανάλυση όπου η κινητή φάση διέρχεται διαρκώς μέσω της στήλης, το πληρωτικό υλικό με C₁₈ που βρίσκεται στη στήλη εκχύλισης, έρχεται σε επαφή με τη ροή της κινητής φάσης μόνο για ορισμένο χρονικό διάστημα (όσο διαρκεί ο χρόνος εκχύλισης). Είναι πιθανό πως αυτή η χρονική περίοδος είναι ανεπαρκής για να επιτευχθεί η πλήρης έκλυση των αναλυτών που αφενός απελευθερώνονται από το υπόστρωμα του εδάφους, αφετέρου όμως επανα-προσροφώνται στο πληρωτικό υλικό C₁₈. Η μείωση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης με τη χρήση πληρωτικού υλικού έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μεθόδους που βασίζονται στην εκχύλιση υπό πίεση (Campone et.al.,2009) (Urraca et.al.,2004) (D'Arco et.al.,2008). Με βάση τα ευρήματα αυτά, δεν προστέθηκε πληρωτικό υλικό στη στήλη εκχύλισης.



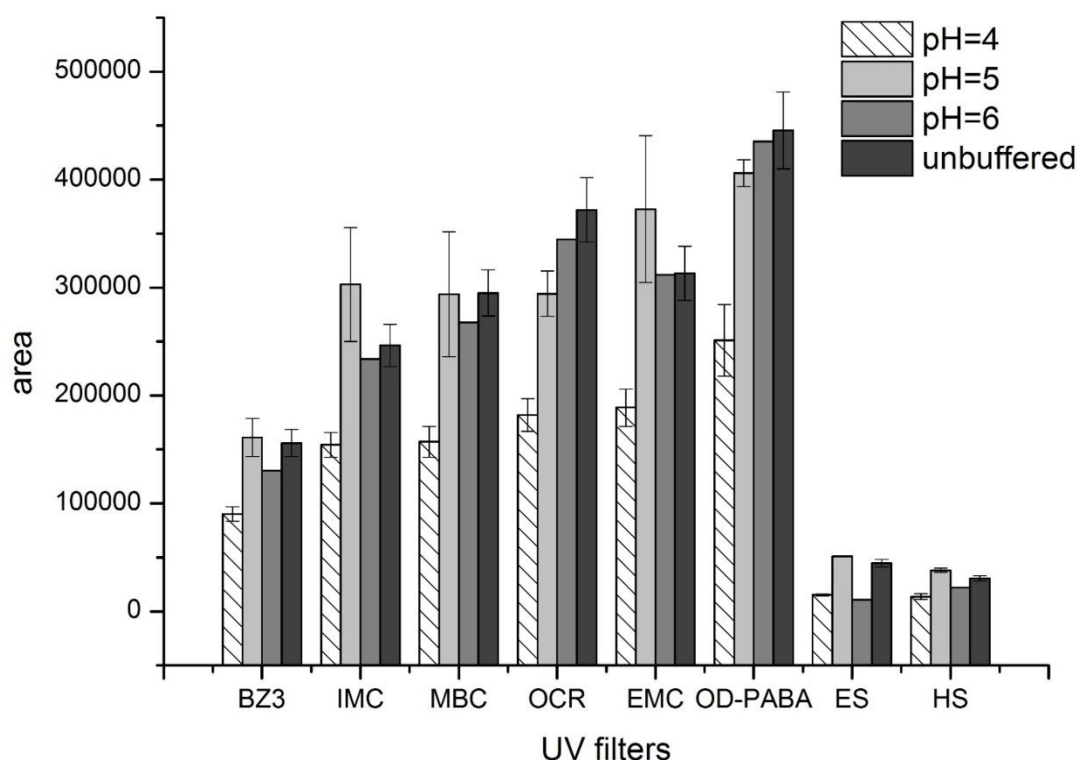
Σχήμα 10. Χρωματογραφήματα OLE-LC δειγμάτων εδάφους που περιέχουν 2.5μg/g φίλτρων UV (BZ3, IMC, MBC, EDP και EMC) και μεταβλητές ποσότητες C₁₈, που λειτουργεί ως παράγοντας διασποράς.

6.3 Επίδραση του pH της κινητής φάσης

Ορισμένα φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας είναι ιοντιζόμενες ενώσεις (ES και HS) ή ασθενή οξέα (όπως το EDP) (Roman et.al., 2011). Συνεπώς, το pH της κινητής φάσης μπορεί να επηρεάσει τόσο τη χρωματογραφική τους κατακράτηση, όσο και την εκχύλιση τους από το στερεό υπόστρωμα. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας σε στατικές φάσεις C₁₈ έχει αποδειχθεί ότι είναι εξίσου αποτελεσματικός τόσο απουσία όσο και παρουσία ασθενών οξέων (συνήθως οξικού ή φορμικού οξέος σε συγκεντρώσεις <0,5%), πράγμα που σημαίνει ότι το pH της κινητής φάσης δεν έχει σημαντική επίδραση στην χρωματογραφική ανάλυση (A.Chisvert et.al., 2018) (Chisvert et.al., 2010). Επομένως

το pH της κινητής φάσης αξιολογήθηκε σε σχέση με την επίδρασή του στην απόδοση της εκχύλισης. Η εξέταση της επίδρασης του pH έγινε ρυθμίζοντας την υδατική φάση σε pH 4, 5,1 και 6,1 και έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά που ελήφθησαν χωρίς τη ρύθμιση της υδατικής φάσης. Το Σχήμα 11 παρουσιάζει τις τιμές των εμβαδών των κορυφών σε διαφορετικές τιμές pH.

Με βάση τα δεδομένα που παρουσιάζονται στα ραβδογράμματα του Σχήματος 11, καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως δεν υπάρχει σημαντική επίδραση του pH στην εκχύλιση των περισσοτέρων ενώσεων. Ως γενικές παρατηρήσεις θα μπορούσαμε να πούμε ότι όξινες τιμές pH δεν ευνοούν την εκχύλιση των αναλυτών, ίσως επειδή σε αυτές τις τιμές pH, τα φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας βρίσκονται στη μη-ιοντισμένη μορφή τους, η οποία προσροφάται πιο εύκολα στην οργανική ύλη του εδάφους. Παράλληλα, οι όξινες τιμές pH δεν ευνοούν την διαλυτοποίηση της οργανικής ύλης του εδάφους η οποία διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην προσρόφηση των οργανικών ενώσεων στο χώμα. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, το pH της κινητής φάσης δεν ρυθμίστηκε για λόγους απλότητας και ευχρηστίας της μεθόδου.

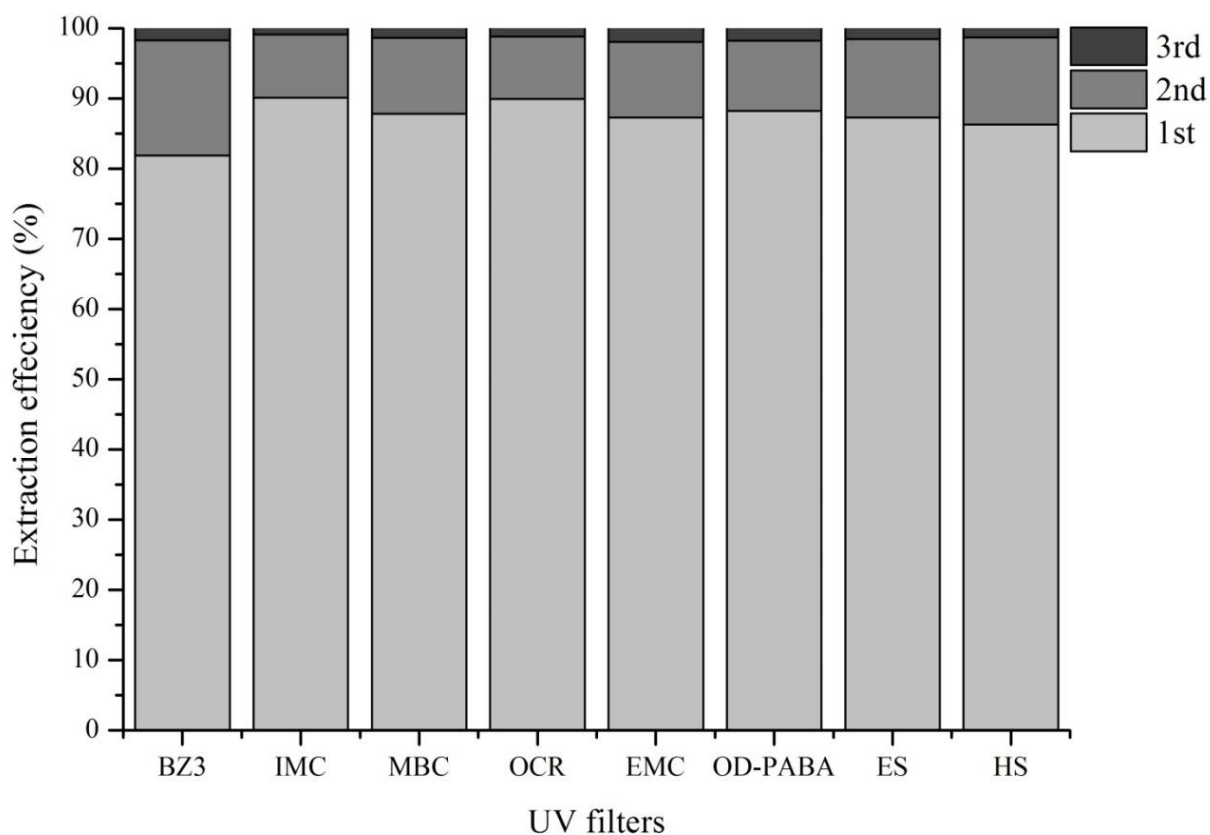


Σχήμα 11. Χρωματογράφημα OLE-LC δείγματος εδάφους (30 mg) που περιέχει 6.25 μg/g φίλτρων UV με μεταβλητή κινητή φάση pH.

6.4 Στάδια εκχύλισης

Στην OLE-LC, η εκχύλιση των αναλυτών από το δείγμα λαμβάνει χώρα δυναμικά, πράγμα που σημαίνει ότι ο διαλύτης εκχύλισης (δηλ. η κινητή φάση) διοχετεύεται συνεχώς μέσω της στήλης εκχύλισης που περιέχει το δείγμα. Ως εκ τούτου, η εκχύλιση πραγματοποιείται για όσο χρονικό διάστημα ο διαλύτης διέρχεται διαμέσου του δείγματος (δηλ. η βαλβίδα βρίσκεται στη θέση έγχυσης). Επομένως η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες που σχετίζονται με τις ιδιότητες των αναλυτών, το υπόστρωμα του δείγματος, τη σύνθεση της κινητής φάσης και τις συνθήκες εκχύλισης. Λαμβάνοντας το άθροισμα των εμβαδών των κορυφών που υπολογίστηκε για τρεις διαδοχικές εκχυλίσεις του ίδιου δείγματος ως το 100% του υλικού που εκχυλίστηκε, συμπεραίνουμε πως το 87% των φίλτρων UV εκχυλίζεται στην πρώτη εκχύλιση, το 11% στην δεύτερη διαδοχική εκχύλιση και λιγότερο από 1,5% στην τρίτη διαδοχική εκχύλιση. Συνεπώς, για την επίτευξη ποσοτικής εκχύλισης (98,5%) απαιτούνται δύο διαδοχικοί κύκλοι εκχύλισης (Σχήμα 12). Αυτά τα ευρήματα έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του José Cavalleiro και των συνεργατών του, που παρατήρησαν ότι το 95% υδρόφιλων αναλυτών (φυτοφαρμάκων) θα μπορούσε να εκχυλιστεί από βιολογικά υποστρώματα (υλικά φυτικής προέλευσης) κατά την πρώτη εκχύλιση (Ferreira et.al., 2016). Με βάση τις παρατηρήσεις των προηγούμενων μελετών (Ferreira et.al., 2016) αλλά και τα δικά μας ευρήματα καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το πρώτο στάδιο εκχύλισης είναι το πιο σημαντικό στην OLE-LC και επιτρέπει την ποσοτική ή ημι-ποσοτική ανάκτηση των αναλυόμενων ουσιών. Αυτό το χαρακτηριστικό αποτελεί πλεονέκτημα, επειδή τόσο η εκχύλιση όσο και η ανάλυση μπορούν να πραγματοποιηθούν σε ένα μόνο βήμα, μειώνοντας σημαντικά τον χρόνο ανάλυσης (συμπεριλαμβανομένης της προετοιμασίας του δείγματος και της χρωματογραφικής ανάλυσης).

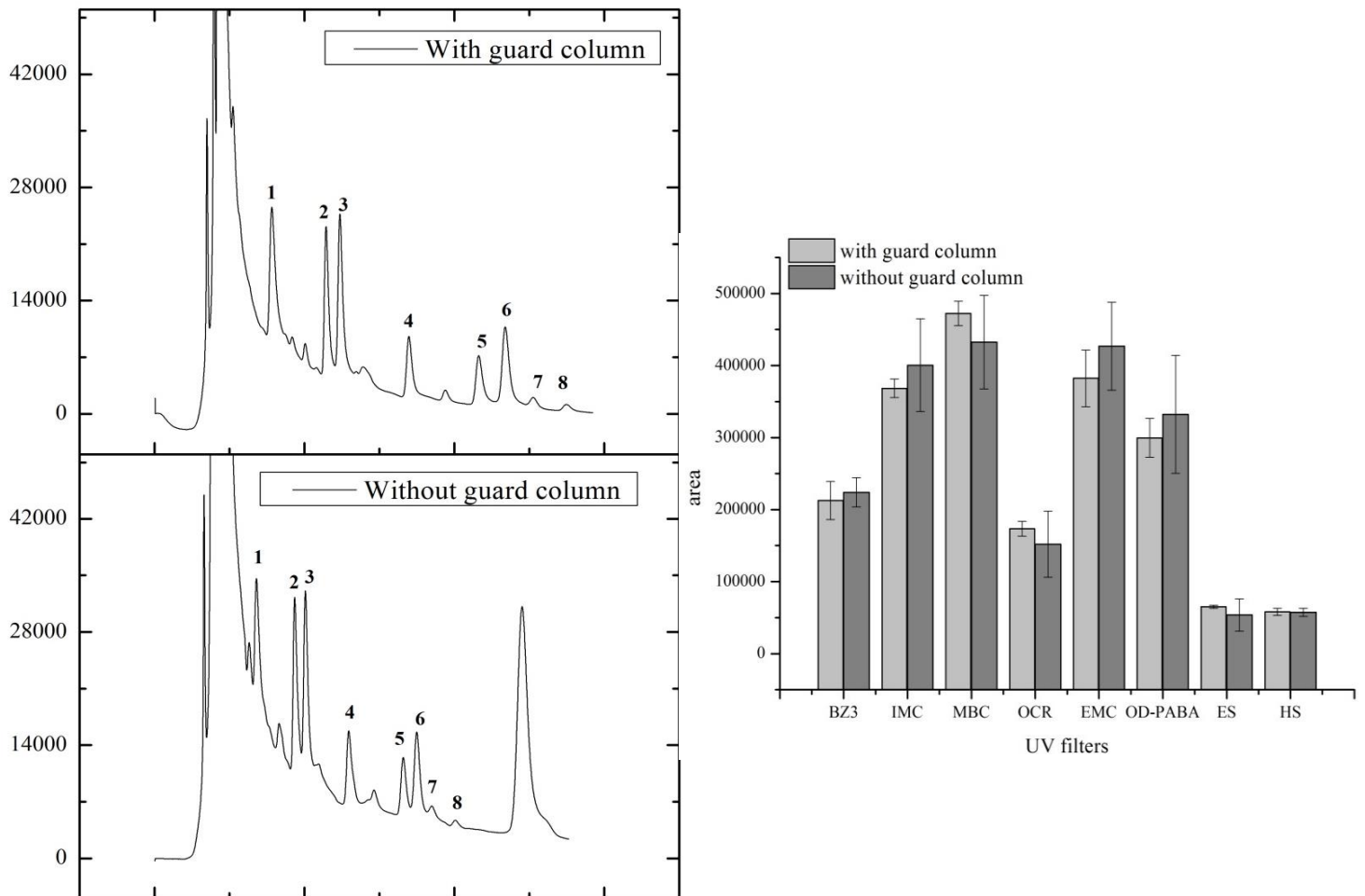
Με βάση τα δεδομένα από την δική μας μελέτη καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι τα σύνθετα δείγματα με πολύπλοκο υπόστρωμα (όπως τα εδάφη και τα ιζήματα) ενδέχεται να απαιτούν και δεύτερο στάδιο εκχύλισης, για την ποσοτική έκλυση των αναλυτών (δηλ. Ανάκτηση > 95%). Ακόμα και έτσι, οι παρατηρούμενες ανακτήσεις στο 1^ο στάδιο εκχύλισης (87%) είναι ικανοποιητικές, ειδικά αν ληφθεί υπόψη ότι παρόμοιες αποδόσεις εκχύλισης έχουν αναφερθεί και για πιο πολύπλοκες και απαιτητικές μεθόδους κατεργασίας δειγμάτων (Gago-Ferrero et.al., 2011a)(Gago-Ferrero et.al., 2011b)(Rodil, et. al., 2008b)(Negreira et.al., 2011b)(Barón et.al., 2013)(Zhang, et al., 2011b). Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, αποφασίστηκε να εκτελεστεί η συνολική διαδικασία εκχύλισης σε δύο στάδια. Η χρήση 2 σταδίων αυξάνει το συνολικό χρόνο της ανάλυσης, ωστόσο δεν την περιπλέκει ούτε εισάγει επιπλέον βήματα ανάλυσης. Αυτό συμβαίνει διότι το ίδιο δείγμα εκχυλίζεται ξανά υπό τις ίδιες συνθήκες, χωρίς ανάγκη από επιπλέον απαιτήσεις σε εξοπλισμό ή πειραματική εργασία.



Σχήμα 12. Σχετικές ανακτήσεις που λαμβάνονται από διαδοχικούς κύκλους εκχύλισης με OLE-LC. Οι σχετικές ανακτήσεις υπολογίστηκαν υποθέτοντας ότι το άθροισμα των εμβαδών των κορυφών που λήφθηκε από τρεις διαδοχικές εκχυλίσεις αντιστοιχεί στο 100% του υλικού που εκχυλίστηκε.

6.5 Επίδραση της πίεσης

Στην OLE-LC, η πίεση μπορεί να επηρεάσει τόσο την απόδοση του χρωματογραφικού διαχωρισμού όσο και την απόδοση της εκχύλισης των αναλυτών από το στερεό δείγμα. Για να τροποποιήσουμε την πίεση της υγρής χρωματογραφίας αντικαταστήσαμε αρχικά τον προεγκατεστημένο σωλήνα από ανοξείδωτο ατσάλι εσωτερικής διαμέτρου 0.17 mm (I.D.) που χρησιμοποιείται εξ ορισμού στη διάταξη HPLC, με σωλήνες PEEK διαφορετικής εσωτερικής διαμέτρου. Με την αύξηση της εσωτερικής διαμέτρου του σωλήνα, η πίεση του συστήματος μειώθηκε και οι κορυφές έγιναν πιο πλατιές λόγω της αύξησης του κενού όγκου στο συνολικό σύστημα. Αυτό με τη σειρά του οδήγησε σε μείωση της απόδοσης του διαχωρισμού μεταξύ των IMC και MBC καθώς και των EDP και EMC. Από την άλλη πλευρά, οι σωλήνες με μικρότερη εσωτερική διάμετρο αύξησαν την αντίθλιψη (back-pressure), που προκάλεσε αυξημένη κατακράτηση των ενώσεων στην χρωματογραφική στήλη, κάτι που είναι σύνηθες για διαχωρισμούς ανάστροφης φάσης (McCalley, 2014), χωρίς όμως να παρατηρηθεί βελτίωση ούτε στην απόδοση του διαχωρισμού ούτε στην απόδοση της εκχύλισης. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκε ο προεγκατεστημένος σωλήνας των 0.17 mm ID.



Σχήμα 13. α) Χρωματογραφήματα OLE-LC με και χωρίς τη χρήση προστήλης (β). Εμβαδά κορυφών των φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας που εκχυλίζονται από το εμβολιασμένο έδαφος με και χωρίς στήλη προστασίας.

Αύξηση της πίεσης του συστήματος προκλήθηκε όταν μια προστήλη τοποθετήθηκε πριν την αναλυτική στήλη, για να προστατεύσει το υλικό της στήλης από προσμίξεις που υπήρχαν στο έδαφος. Η τοποθέτηση της προστήλης (2cm x 4.0mm, 3μm) αύξησε την πίεση του συστήματος από περίπου 130 ± 10 bar σε 170 ± 10 bar. Τα χρωματογραφήματα και το εμβαδό της κορυφής του κάθε αναλύτη, που προκύπτει από την εκχύλιση ενός δείγματος εδάφους με και χωρίς την προστήλη, παρουσιάζεται στο Σχήμα 13. Όπως παρατηρείται, το εμβαδό των κορυφών είναι παρόμοιο για όλες τις ενώσεις, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πίεση δεν αύξησε την απόδοση της εκχύλισης, αν και ο χρωματογραφικός διαχωρισμός βελτιώθηκε λόγω της αυξημένης κατακράτησης των αναλυτών. Επιπροσθέτως, η αναπαραγωγιμότητα των μετρήσεων (υπολογισμένη από τα εμβαδά των κορυφών) βελτιώθηκε σημαντικά παρουσία της προστήλης, πιθανώς επειδή η προστήλη μπορούσε να συγκρατήσει κάποιες προσμίξεις που συν-εκλύονταν από το υπόστρωμα του εδάφους. Συγκεκριμένα, το RSD από την εκχύλιση ενός εμβολιασμένου δείγματος εδάφους,

παρουσία της προστήλης, κυμάνθηκε από 3,5-12,5% (μέση τιμή 7,1% για όλες τις ενώσεις, $n=3$) ενώ απουσία της προστήλης το RSD κυμάνθηκε από 9,0-31,8% (μέση τιμή 20,1% για όλες τις ενώσεις, $n=3$).

6.6 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία είναι μια άλλη σημαντική παράμετρος στην OLE-LC, καθώς μπορεί να επηρεάσει τόσο την απόδοση της εκχύλισης όσο και τον χρωματογραφικό διαχωρισμό. Η αύξηση της θερμοκρασίας συνήθως αυξάνει τη διαλυτότητα των αναλυτών, διευκολύνει τη διάχυση τους και βελτιώνει τη μεταφορά της μάζας τους από το στερεό υπόστρωμα στον διαλύτη, μειώνοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυτών και του υποστρώματος (δηλαδή διασπώντας τις διαμοριακές δυνάμεις, όπως είναι οι δυνάμεις van der Waals, οι δεσμοί υδρογόνου και οι δυνάμεις διπόλου / διπόλου). Επίσης, οι υψηλές θερμοκρασίες μειώνουν το ιξώδες και την επιφανειακή τάση του διαλύτη, διευκολύνοντας έτσι τη διείσδυση του διαλύτη στα σωματίδια του υποστρώματος (Richter et.al.,2012) (www.chromacademy.com) (Osman et.al., 2013). Για τους ίδιους λόγους, η αύξηση της θερμοκρασίας μειώνει συνήθως και την κατακράτηση των ενώσεων κατά τη διάρκεια του χρωματογραφικού διαχωρισμού (www.chromacademy.com) (McCalley, 2014).

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων που εκτελέστηκαν με OLE-LC, η αναλυτική στήλη θερμοστατούνταν ήδη, λόγω των αναγκών της χρωματογραφικής ανάλυσης. Ωστόσο, η στήλη εκχύλισης και η κινητή φάση ήταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για να εκτιμηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας αρχικά θερμοστατήθηκαν οι διαλύτες στους 40°C, για να ταιριάζουν με τη θερμοκρασία της αναλυτικής στήλης. Η αύξηση της θερμοκρασίας είχε αρνητική επίδραση στην OLE-LC καθώς α) η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων ήταν δύσκολη λόγω της αστάθειας της γραμμής αναφοράς, β) εμφανίστηκαν κορυφές της μήτρας του υποστρώματος (ghost peaks) που υποδήλωναν την ταυτόχρονη εκχύλιση συστατικών του υποστρώματος και γ) η αναπαραγωγιμότητα των εκχυλίσεων μειώθηκε. Πιο συγκεκριμένα, εκτός από μερικές μικρές κορυφές της μήτρας του υποστρώματος που εμφανίζονταν τυχαία στο χρωματογράφημα, εμφανίστηκαν δύο μεγάλες κορυφές της μήτρας του υποστρώματος στα 14,6 και 21,3 min που συμπίπτουν με τους χρόνους κατακράτησης των OCR και EMC αντίστοιχα. Ως αποτέλεσμα, τα μετρούμενα

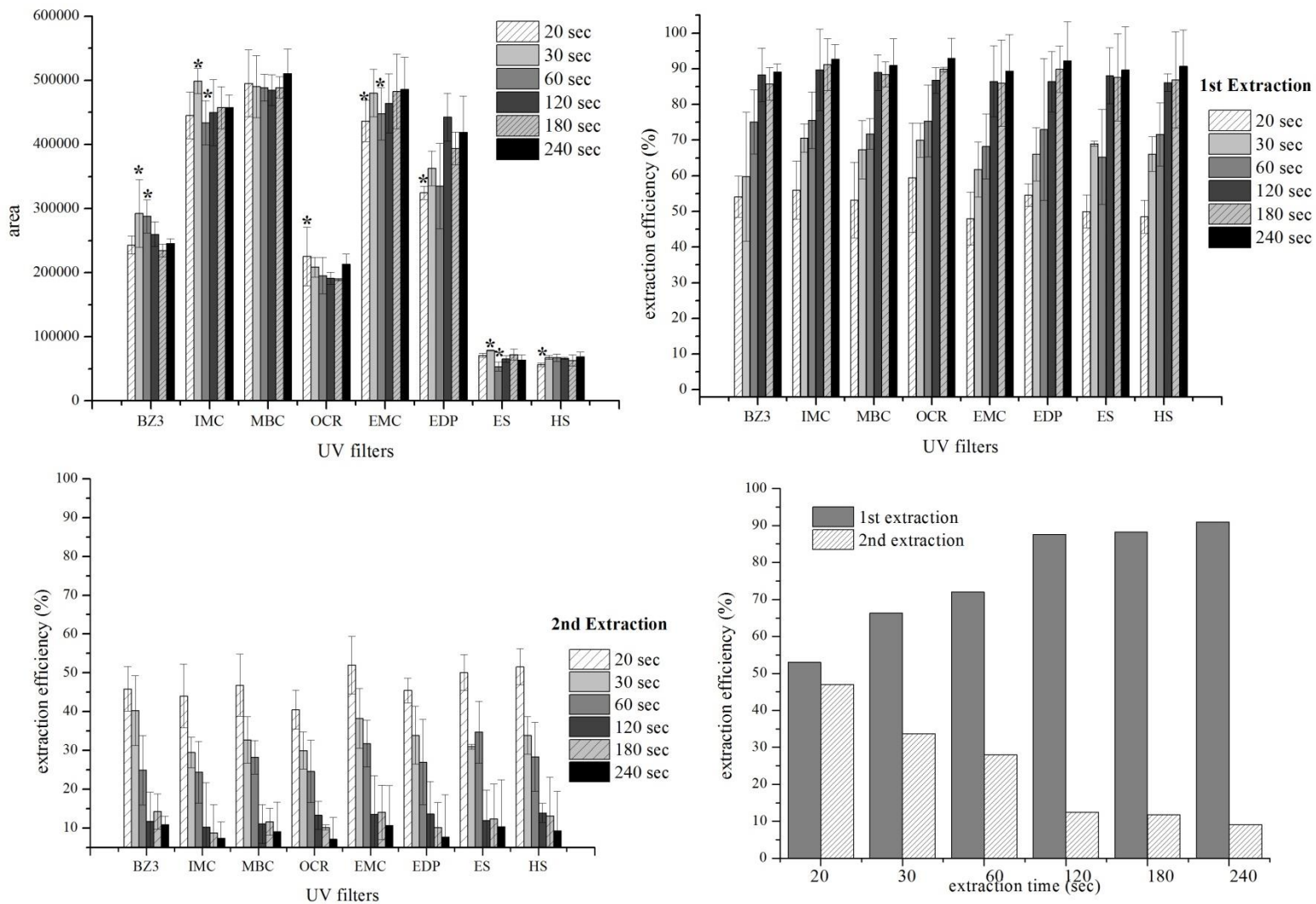
εμβαδά των κορυφών των δύο αυτών ενώσεων ήταν πολύ υψηλότερα από τα αναμενόμενα. Για τις άλλες ενώσεις η συν-έκλυση των συστατικών του υποστρώματος του εδάφους, προκάλεσε σημαντική απόκλιση στην αναπαραγωγιμότητα των εμβαδών των κορυφών. Σε σύγκριση με τις τιμές των εμβαδών από την OLE-LC σε συνθήκες περιβάλλοντος, το RSD των εμβαδών των κορυφών στους 40°C άλλαξε σχεδόν κατά $\pm 3\%$ για τις BZ3 και HS, $\pm 19\%$ για τις MBC και ES και έως $\pm 45\%$ για τις IMC και EDP. Η αύξηση της θερμοκρασίας στους 50 ° C, εκτός από την εμφάνιση κορυφών του υποστρώματος και την μείωση της αναπαραγωγιμότητας των μετρήσεων, προκάλεσε επιπλέον μετατόπιση της γραμμής αναφοράς, αυξημένη κατακράτηση των αναλυτών και ευρύτερες κορυφές. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, οι εκχυλίσεις πραγματοποιούνταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (περίπου 22-25°C).

6.7 Χρόνος εκχύλισης

Ο χρόνος εκχύλισης στην OLE-LC αναφέρεται στον χρόνο που η βαλβίδα παραμένει στη θέση έγχυσης έτσι ώστε η κινητή φάση να ρέει διαμέσου της στήλης εκχύλισης, που περιέχει το δείγμα και να πραγματοποιεί την εκχύλιση των αναλυτών από το στερεό δείγμα. Η επίδραση του χρόνου εκχύλισης στην αποτελεσματικότητα της OLE-LC εκτιμήθηκε συγκρίνοντας τα εμβαδά κορυφών των εκχυλισμένων φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας, που ελήφθησαν από 2 διαδοχικές εκχυλίσεις σε διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης, δηλαδή σε 20, 30, 60, 120, 180 και 240 sec. Τα αποτελέσματα του Σχήματος 14 δείχνουν ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην συνολική απόδοση της εκχύλισης, σε διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης. Σύμφωνα με το *t*-test, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του μέσου όρου των εμβαδών των κορυφών (υπολογιζόμενου από τον μέσο όρο των αποτελεσμάτων για κάθε ένωση σε όλους τους χρόνους εκχύλισης) με εκείνου που παρατηρείται σε κάθε χρόνο εκχύλισης ξεχωριστά, σε επίπεδο πιθανότητας 95% για χρόνους εκχύλισης μεγαλύτερους από 120 sec. Σε χαμηλότερους χρόνους εκχύλισης όμως ορισμένα δεδομένα εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά από τον μέσο όρο των εμβαδών των κορυφών και υποδεικνύονται με ένα αστερίσκο στο Σχήμα 14. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, ο χαμηλότερος χρόνος εκχύλισης που εξασφαλίζει την αποτελεσματικότερη ανάκτηση των αναλυτών με καλή αναπαραγωγιμότητα είναι τα

120 sec (για κάθε έναν από τους δύο κύκλους εκχύλισης) και ως εκ τούτου αποφασίστηκε ως βέλτιστος.

Υποθέτοντας ότι το 100% των ενώσεων που πρόκειται να εκχυλιστούν λαμβάνεται σε δύο κύκλους εκχύλισης, υπολογίστηκε η ανάκτηση των αναλυτών σε κάθε κύκλο εκχύλισης για διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης. Τα αποτελέσματα που εμφανίζονται στα ραβδογράμματα του Σχήματος 14 δείχνουν ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος εκχύλισης τόσο μεγαλύτερη είναι η ανάκτηση των αναλυτών στον πρώτο κύκλο εκχύλισης. Οι μικρότεροι χρόνοι εκχύλισης είναι επομένως κατάλληλοι για την λήψη ενός “αποτυπώματος” της σύνθεσης του δείγματος, ενώ ημι-ποσοτική ανάλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης στον πρώτο κύκλο εκχύλισης. Τέλος, για ποσοτική ανάλυση απαιτούνται 2 κύκλοι εκχύλισης. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μέθοδος μπορεί να ικανοποιήσει διαφορετικές ανάγκες ανάλυσης (ποιοτική, ημι-ποσοτική ή ποσοτική) μειώνοντας περιττές πειραματικές εργασίες.

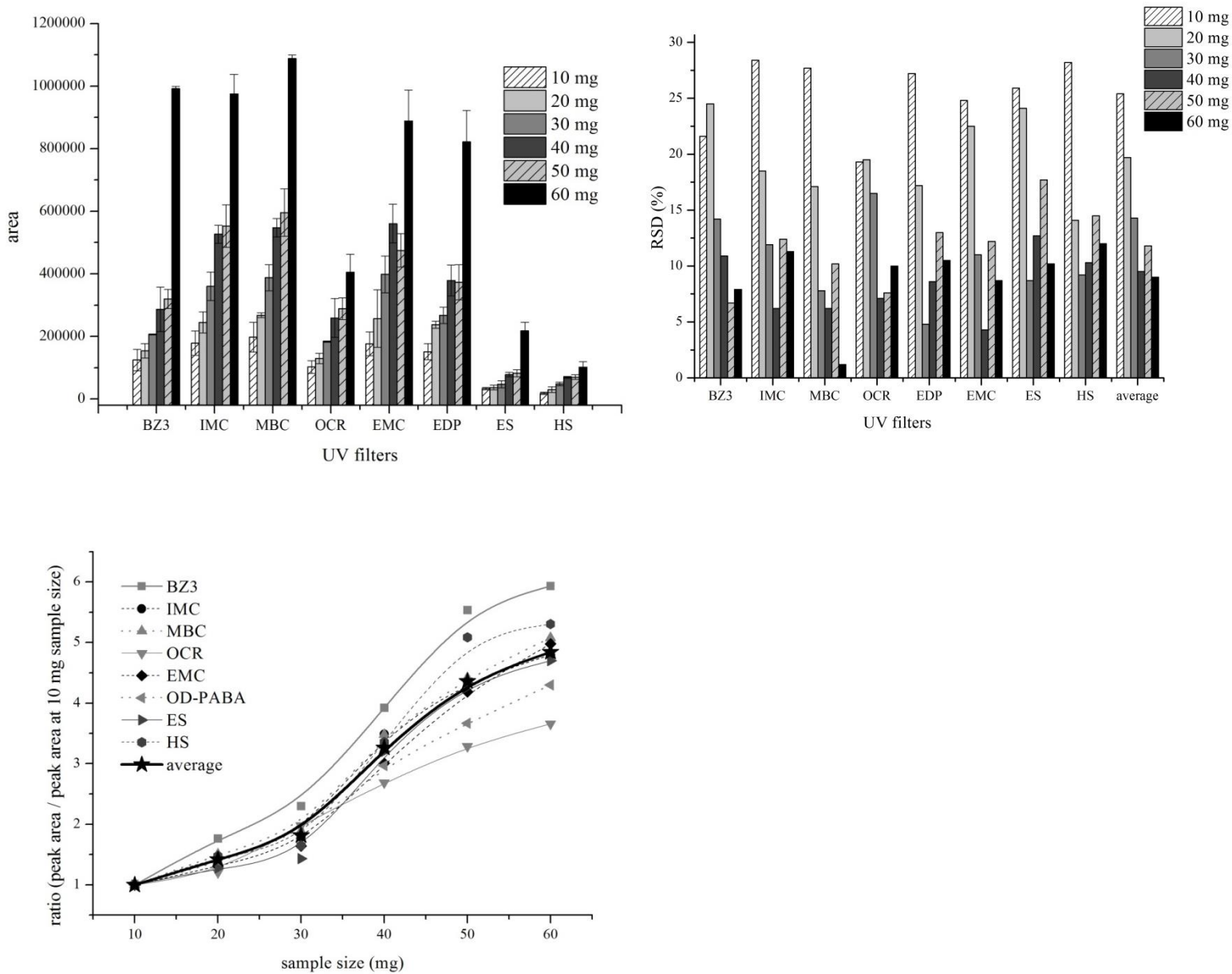


Σχήμα 14. (α) Συνολικά εμβαδά κορυφών των φίλτρων UV που εκχυλίστηκαν από 30 mg εμβολιασμένου εδαφικού δείγματος (6.25 μg / g) μετά από δύο κύκλους εκχύλισης, σε διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης. Τα γραφήματα με τον αστερίσκο δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά από τη μέση ανάκτηση, που υπολογίστηκε ως ο μέσος όρος των εμβαδών των κορυφών σε όλους τους χρόνους εκχύλισης (β) Απόδοση της εκχύλισης στον πρώτο κύκλο εκχύλισης, σε διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης (γ) Απόδοση της εκχύλισης στον δεύτερο κύκλο εκχύλισης, σε διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης (δ) Μέσος όρος της απόδοσης της εκχύλισης (όλων των φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας) για κάθε κύκλο εκχύλισης, σε διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης.

6.8 Ποσότητα δείγματος

Η ποσότητα του δείγματος που μπορεί να εκχυλιστεί αποτελεσματικά, υπό τις πειραματικές συνθήκες της OLE-LC, διερευνήθηκε μεταβάλλοντας την ποσότητα του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε ανάλυση (10, 20, 30, 40, 50, 60 mg). Η ποσότητα των φίλτρων UV που εκχυλίστηκαν, αυξήθηκε με την αύξηση της ποσότητας του δείγματος (Σχήμα 15), αλλά η βελτίωση της απόδοσης της εκχύλισης δεν ήταν ευθέως ανάλογη με τη μάζα του δείγματος. Θεωρώντας ότι η εκχύλιση επιτυγχάνεται 100% όταν χρησιμοποιούνται 10 mg χρώματος για εκχύλιση (με βάση την μάλλον αυθαίρετη υπόθεση ότι μια μικρότερη μάζα δείγματος θα είναι πιο εύκολα προσβάσιμη από τον διαλύτη και θα διευκολύνει την εκχύλιση των αναλυτών) υπολογίστηκε η απόδοση της εκχύλισης σε μεγαλύτερες ποσότητες δείγματος. Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης εκφράστηκε ως ο λόγος του εμβαδού της κορυφής του κάθε αναλύτη (για διαφορετικές ποσότητες δείγματος) προς το εμβαδόν της κορυφής του κάθε αναλύτη που μετρήθηκε στα 10 mg δείγματος και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 15. Όπως παρατηρείται, η αναλογία αυξάνεται γραμμικά μέχρι τα 30 mg και λογαριθμικά σε μεγαλύτερες ποσότητες δειγμάτων. Επιπλέον, καθώς το μέγεθος του δείγματος αυξάνεται, η αναλογία της κάθε ένωσης αποκλίνει από τη μέση αναλογία, που σημαίνει ότι η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης του κάθε αναλύτη αλλάζει ανάλογα με την ποσότητα του δείγματος. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά θεωρήθηκε ότι η βέλτιστη ποσότητα δείγματος είναι τα 30 mg. Επιπροσθέτως, υπήρξαν και άλλοι λόγοι που συνετέλεσαν στην επιλογή των 30 mg δείγματος ως βέλτιστη ποσότητα δείγματος. Ο πρώτος είναι η αναπαραγωγιμότητα των εκχυλίσεων. Το RSD των εμβαδών των κορυφών χειροτερεύει όσο ελαττώνεται η ποσότητα του χρησιμοποιούμενου δείγματος και φτάνει σε τιμές 20-25% σε σύγκριση με τα μεγαλύτερα μεγέθη δείγματος (<15%). Ένας άλλος λόγος είναι η συν-έκλυση των συστατικών του υποστρώματος. Σε μεγάλες ποσότητες δείγματος παρατηρήθηκε σημαντική συν-έκλυση συστατικών της μήτρας του υποστρώματος του δείγματος που παρεμπόδιζε την ανάλυση. Χαρακτηριστικά, όταν εκχυλίστηκαν 50 mg δείγματος, ο χρόνος καθαρισμού που ήταν αναγκαίος για να απομακρυνθούν εντελώς οι προσμίξεις από το υπόστρωμα και να ληφθεί σταθερή γραμμή αναφοράς (baseline) έφτανε την 1 ώρα. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, η ποσότητα των 30 mg θεωρήθηκε λογικός συμβιβασμός μεταξύ της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης, της

αναπαραγωγιμότητας και του χρωματογραφικού διαχωρισμού, της απόδοσης του δείγματος και της ομοιόμορφης απόκρισης για όλες τις ενώσεις.



Σχήμα 15. (α) Εμβαδά κορυφών με αυξανόμενη μάζα δείγματος (β) Αναλογία εμβαδού των κορυφών των φίλτρων UV που εκχλύστηκαν από μεταβλητές ποσότητες μάζας (10-60 mg) προς το εμβαδό των κορυφών που εκχλύστηκε από 10 mg δείγματος (γ) το RSD των μετρήσεων για διαφορετικές μάζες δείγματος.

7. Αναλυτικά πλεονεκτήματα και ανάπτυξη μεθόδου ποσοτικοποίησης

Παρόλο που η OLE-LC έχει πολλά πλεονεκτήματα, έχει σχεδιαστεί ως μια μέθοδος ποιοτικού ελέγχου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την γρήγορη και εύκολη χρωματογραφική αποτύπωση της σύστασης του δείγματος (Ferreira et.al.,2016). Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις είναι αναγκαίος ο ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών του δείγματος ή έστω η εκτίμηση της σχετικής αφθονίας των αναλυτών (ημι-ποσοτική ανάλυση).

Η ποσοτικοποίηση στην ανάλυση LC είναι μια απλή διαδικασία που βασίζεται συνήθως στη μέθοδο εξωτερικής βαθμονόμησης στην οποία αναλύονται πρότυπα διαλύματα των αναλυτών με σκοπό την προετοιμασία των καμπυλών βαθμονόμησης. Η συγκέντρωση των αναλυτών στα άγνωστα δείγματα προσδιορίζεται στη συνέχεια, με υπολογισμό της συγκέντρωσης που αντιστοιχεί στο μετρούμενο σήμα μέσω των (συνήθως) γραμμικών εξισώσεων βαθμονόμησης. Για να πραγματοποιηθεί εξωτερική βαθμονόμηση στην OLE-LC, θα πρέπει να γίνει εκχύλιση των δειγμάτων με υπόστρωμα παρόμοιο με εκείνο του άγνωστου δείγματος, σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης. Δεδομένου ότι τέτοια δείγματα ή πιστοποιημένα υλικά αναφοράς δεν είναι διαθέσιμα, αποφασίστηκε να δοκιμαστεί η μέθοδος σταθερής προσθήκης. Σε αυτό το πείραμα, δείγματα εδάφους που περιείχαν γνωστές ποσότητες φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας, εμβολιάστηκαν με ένα πρότυπο διάλυμα φίλτρων UV και εκχυλίστηκαν υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες. Στη συνέχεια, τα εμβάδα των κορυφών χρησιμοποιήθηκαν για γίνει υπολογιστεί η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος, βάσει των αρχών της βαθμονόμησης της σταθερής προσθήκης ενός σημείου. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος σταθερής ενός σημείου επειδή είναι πιο βολική σε σύγκριση με τη βαθμονόμηση πολλαπλών σημείων, που θα απαιτούσε αρκετά επίπεδα εμβολιασμού για κάθε δείγμα, μειώνοντας έτσι σημαντικά τη ημερήσια ρυθμοδότηση της μεθόδου (δηλ. τον αριθμό των δειγμάτων που μπορούν να αναλυθούν ανά ημέρα). Αν και τα φυσικοχημικά φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα κατά την εκχύλιση εμβολιασμένων δειγμάτων αναμένεται να διαφέρει από εκείνη των πραγματικών δειγμάτων (συνεπώς και η απόδοση της εκχύλισης) οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 44-138%. Με βάση αυτά τα συμπεράσματα, συμπεραίνεται πως η εφαρμογή της προσθήκης γνωστής ποσότητας θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για ημι-ποσοτικές αναλύσεις των αναλυτών στο δείγμα.

Δεδομένου ότι η OLE-LC πραγματοποιεί ποσοτική εκχύλιση εντός 2 κύκλων εκχύλισης, έγινε η υπόθεση ότι το συνολικό εμβαδόν από 2 κύκλους εκχύλισης αντιστοιχεί στη συνολική μάζα των φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας που εκχυλίζονται από το δείγμα. Έτσι, εξετάστηκε η δυνατότητα χρήσης εξωτερικής καμπύλης βαθμονόμησης για τη ληφθούν ποσοτικές μετρήσεις. Για τον λόγο αυτό δείγματα εδάφους εμβολιάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις φίλτρων UV (από 0,25 έως 25 $\mu\text{g} / \text{g}$ χώματος) και εκχυλίστηκαν με OLE-LC. Τα μετρούμενα εμβαδά αυξήθηκαν γραμμικά με την ποσότητα των φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας, για ένα εύρος που εκτείνεται σε δύο τάξεις μεγέθους (Πίνακας 1), που υποδηλώνει ότι η OLE-LC ανταποκρίνεται γραμμικά σε σχετικά μεγάλο εύρος μαζών (ή συγκεντρώσεων). Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν καμπύλες βαθμονόμησης, κάνοντας έγχυση πρότυπων διαλυμάτων του αναλύτη, που περιέχει 2×10^{-6} - 2×10^{-4} mg φίλτρων UV και οι αντίστοιχες καμπύλες βαθμονόμησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 1. Καμπύλες βαθμονόμησης από την εκχύλιση 30 mg εδάφους εμβολιασμένου με 0,25-25 $\mu\text{g} / \text{g}$ φίλτρα UV.

Compound	Slope	Intercept	R²
BZ3	0.31×10^5	-11500	0.9898
IMC	0.92×10^5	-54990	0.9797
MBC	0.70×10^5	22705	0.9896
OCR	15.6×10^3	248040	0.9010
EDP	48.7×10^3	299880	0.9027
EMC	1.07×10^5	-14421	0.9786
ES	8.0×10^3	25149	0.9401
HS	6.0×10^3	63.3	0.9926

Πίνακας 2. Καμπύλες βαθμονόμησης από πρότυπα διαλύματα σε εύρος συγκεντρώσεων από 2×10^{-6} έως 2×10^{-4} mg.

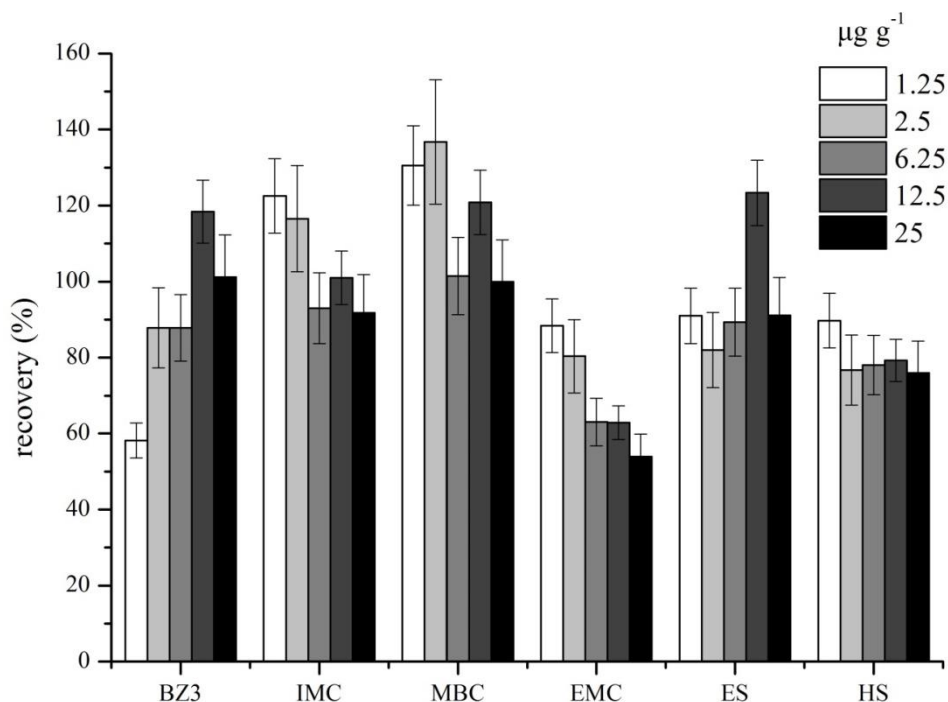
Compound	Slope	Intercept	R²
BZ3	3×10^9	-12515	0.9966
IMC	1×10^{10}	-62110	0.9951
MBC	7×10^9	-26363	0.9970
OCR	3×10^9	-4691	0.9947
EDP	6×10^9	-34478	0.9935
EMC	2×10^{10}	-61053	0.9959
ES	1×10^9	-7717	0.9945
HS	9×10^8	-5525	0.9934

Έπειτα, τα εμβαδά κορυφών που μετρήθηκαν από την OLE-LC προσαρμόστηκαν στις καμπύλες βαθμονόμησης που παρασκευάστηκαν από πρότυπα διαλύματα (Πίνακας 2) και υπολογίστηκε η μάζα των φίλτρων UV που εκχυλίστηκε. Με βάση την ποσότητα των φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας που είχαν εμβολιαστεί στα δείγματα εδάφους, προσδιορίστηκε η ανάκτηση των φίλτρων UV. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, οι ανακτήσεις ήταν μόνο 30% σε σχέση με το αναμενόμενο, με βάση το επίπεδο εμβολιασμού. Από αυτή τη μελέτη αποκλείσαμε δύο ενώσεις (OCR και EDP) οι οποίες επηρεάστηκαν σημαντικά από την συνέκλυση συστατικών της μήτρας του υποστρώματος καθώς ο ανιχνευτής UV-Vis δεν μπορούσε διακρίνει τις ενώσεις-στόχους από την παρουσία παρεμποδίσεων (όπως για παράδειγμα θα μπορούσε να γίνει με έναν πιο εξελιγμένο ανιχνευτή όπως ο MS).

Οι χαμηλές ανακτήσεις που υπολογίστηκαν με αυτή την προσέγγιση ήταν μη αναμενόμενες, δεδομένου ότι δύο εκχυλίσεις έχουν αποδειχθεί ότι εκχυλίζουν ποσοτικά τα φίλτρα UV από δείγματα εδάφους. Αυτό σημαίνει ότι οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της OLE-LC είναι περίπλοκες και δεν μπορούν να εξηγηθούν μόνο με υπολογισμούς ισοζυγίου μάζας. Μια εξήγηση είναι ότι τα φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας εκχυλίζονται μόνο από μια μικρή ποσότητα διαλύτη, ενώ ο επιπλέον όγκος διαλύτη αραιώνει το εκχύλισμα εντός της ροής του συστήματος της HPLC (in-line). Μια άλλη πιθανότητα είναι ότι όλα τα φίλτρα UV εκχυλίζονται στον πρώτο κύκλο εκχύλισης, αλλά δεν φτάνουν όλα τα εκχυλίσματα στη στήλη, επειδή η

βαλβίδα έγχυσης επανέρχεται στη θέση «load». Στον δεύτερο κύκλο εκχύλισης, ο διαλύτης αραιώνει το εκχύλισμα και ως αποτέλεσμα η συνολική ποσότητα των φίλτρων UV φαίνεται να είναι χαμηλότερη. Είναι επίσης πιθανό να συμβαίνουν και οι δύο αυτοί μηχανισμοί. Δεδομένου ότι οι ανακτήσεις ήταν σχεδόν σταθερές για όλα τα φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας σε όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης, σε ένα εύρος συγκέντρωσης που εκτείνεται σε δύο τάξεις μεγέθους, είναι πιθανοί και οι δύο αυτοί μηχανισμοί.

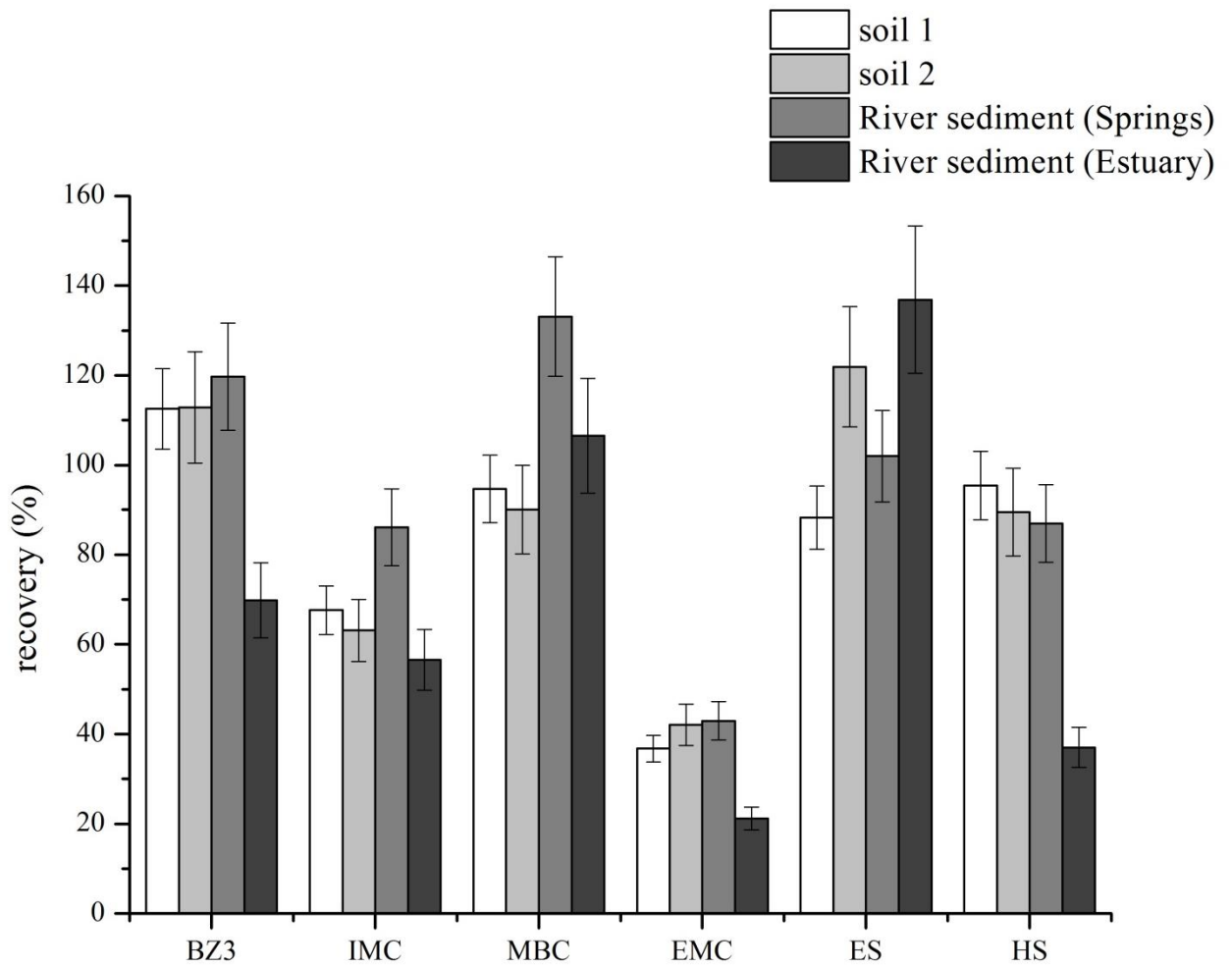
Αν και η ερμηνεία αυτών των αποτελεσμάτων είναι πολύπλοκη, οι ανακτήσεις για όλα τα φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας ήταν σταθερές, ανεξάρτητα από το επίπεδο συγκέντρωσης (μέση ανάκτηση = $30.5\% \pm 5.1$). Λόγω αυτής της διαπίστωσης, έγινε η υπόθεση πως η προσαρμογή ενός γενικού συντελεστή διόρθωσης (correction factor) θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να διορθώσει τις χαμηλές ανακτήσεις. Πολλαπλασιάζοντας όλες τις ανακτήσεις με ένα συντελεστή διόρθωσης που ισούται με 3, έγινε ικανοποιητική διόρθωση των ανακτήσεων, οι οποίες κυμαίνονταν από 76-123% με εξαίρεση την EMC που παρουσίαζε χαμηλότερες ανακτήσεις (Σχήμα 16). Οι τιμές αυτές, βρίσκονται εντός του εύρους των ανακτήσεων που έχουν αναφερθεί σε άλλες μελέτες που χρησιμοποιούν πιο πολύπλοκες μεθόδους προκατεργασίας δειγμάτων όπως PLE, εκχύλιση στερεάς φάσης με διασπορά υποστρώματος (MSPD), Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα (MAE), κλπ (A.Chisvert et.al, 2018) (Gago-Ferrero et.al., 2011a) (Gago-Ferrero et.al., 2011b) (Rodil. et.al., 2008b) (Negreira et al., 2011b) (Barón et.al., 2013) (Zhang et.al., 2011b). Επίσης θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με έναν απλό ανιχνευτή UV, και σε ένα μόνο μήκος κύματος ($\lambda = 313 \text{ nm}$) που δεν είναι το μήκος κύματος με τη μέγιστη απορρόφηση όλων των ενώσεων. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί, ότι οι υψηλότερες ανακτήσεις ελήφθησαν στα χαμηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης, πιθανώς επειδή σε χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης αναλυτών η συμβολή των συστατικών του υποστρώματος που συνεκλούνται επηρεάζει το μετρούμενο εμβαδό των κορυφών. Ωστόσο, αυτό το πρόβλημα μπορεί να μετριαστεί, αν χρησιμοποιηθεί ένας πιο εκλεκτικός ανιχνευτής, όπως το MS ή συστοιχίας διόδων (DAD).



Σχήμα 16. Διορθωμένες ανακτήσεις των φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας από δείγματα εδάφους σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης

Για περαιτέρω επιβεβαίωση της ακρίβειας αυτού του εμπειρικού υπολογισμού, αναλύθηκαν δύο δείγματα εδάφους και τέσσερα ιζήματα ποταμών εμβολιασμένα με 6,25 µg / g από κάθε φίλτρο UV. Με εξαίρεση την EMC, η οποία εμφάνισε χαμηλές ανακτήσεις, οι ανακτήσεις όλων των άλλων ενώσεων κυμαίνονταν μεταξύ 67-136% (Σχήμα 17) που είναι παρόμοιες με εκείνες που ελήφθησαν από το δείγμα εδάφους που χρησιμοποιήθηκε κατά τη βελτιστοποίηση και βαθμονόμηση της μεθόδου. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι δύο από τα δείγματα ιζημάτων δεν μπόρεσαν να αναλυθούν, επειδή παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της πίεσης που είχε ως αποτέλεσμα τη διαρροή του διαλύτη από τις σωληνώσεις. Αυτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα της σύνθεσης του δείγματος και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για την κατανόηση των αιτιών αλλά κυρίως για την εξάλειψη πιθανών περιορισμών που μπορεί να οφείλονται στην διάταξη της οργανολογίας ή στις αναλυτικές συνθήκες που εφαρμόζονται στην OLE-LC. Αν και ο αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την μελέτη δεν επαρκεί ώστε να γίνει εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, φαίνεται πως η μέθοδος λειτουργεί καλύτερα σε δείγματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανική ύλη (<10%) και συγκεντρώσεις ανθρακικών αλάτων μεγαλύτερες από 10%. Βέβαια, αυτές οι παρατηρήσεις δεν εξηγούν επαρκώς την αύξηση της πίεσης στο σύστημα, οπότε απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές ώστε να

διαλευκανθεί η επίδραση της σύνθεσης του υποστρώματος κατά την ανάλυση με OLE-LC.



Σχήμα 17. Ανακτήσεις των φίλτρων UV από διαφορετικά (εμβολιασμένα) δείγματα.

8. Συμπεράσματα

Σε αυτή την μεταπτυχιακή εργασία, αξιολογήθηκε η εφαρμογή της OLE-LC στην εκχύλιση μη πολικών οργανικών ενώσεων από σύνθετα στερεά υποστρώματα, διερευνώντας μια σειρά πειραματικών παραμέτρων που σχετίζονται με την αποτελεσματικότητα τόσο της εκχύλισης όσο και του χρωματογραφικού διαχωρισμού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά που ελήφθησαν, η OLE-LC είναι μια μάλλον αυτόνομη μέθοδος κατεργασίας δειγμάτων, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις δεν υπήρχε ανάγκη προσαρμογής των πειραματικών συνθηκών. Πιο συγκεκριμένα, η επίδραση της θερμοκρασίας, της πίεσης και του χρόνου εκχύλισης δεν είχε σημαντική επίδραση στην αναλυτική απόδοση της μεθόδου. Αυτό το χαρακτηριστικό ενισχύει την αξία της OLE-LC, η οποία ήδη προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα όπως η άμεση σύζευξη της διαδικασίας της εκχύλισης με HPLC χωρίς πρόσθετες συσκευές ή οργανολογία καθώς και την εξάλειψη των περισσότερων σταδίων προετοιμασίας του δείγματος. Παρά τα πλεονεκτήματα αυτά, πρέπει να διασαφηνιστούν διάφορες πτυχές της OLE-LC. Οι ακριβείς διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της δυναμικής εκχύλισης του διαλύτη με OLE-LC δεν είναι σαφείς, αλλά παίζουν σημαντικό ρόλο στο μετασχηματισμό των ποιοτικών δεδομένων που αφορούν την παρουσία των αναλυτών, σε ποσοτικές πληροφορίες σχετικά με την αφθονία τους στο δείγμα. Μία σταδιακή συλλογή των κλασμάτων έκλουσης (στην έξοδο της στήλης εκχύλισης) θα βοηθούσε στον προσδιορισμό της ποσότητας των αναλυτών που εξέρχονται από τη στήλη εκχύλισης και εισέρχονται στην στήλη LC ως συνάρτηση του χρόνου και του όγκου της κινητής φάσης. Όσον αφορά τη βαθμονόμηση, ένα πιστοποιημένο υλικό που περιέχει μεταβλητές ποσότητες των αναλυτών-στόχων θα ήταν ο ιδανικός τρόπος για τη βαθμονόμηση της μεθόδου με σκοπό την λήψη ποσοτικών δεδομένων. Με τις ήδη υπάρχουσες γνώσεις, η βαθμονόμηση σταθερής προσθήκης ή ένας διορθωτικός παράγοντας μπορεί να αποτελέσει τη βάση για ημι-ποσοτικές ή ποσοτικές μετρήσεις. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται επίσης ώστε να γίνει ξεκάθαρη η διαδικασία εκχύλισης και ενδεχομένως να επεκταθεί η χρησιμότητα της OLE-LC στην έρευνα των χημικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του στερεού υποστρώματος και των αναλυτών-στόχων.

Βιβλιογραφία

- Barón, E., Gago-Ferrero, P., Gorga, M., Rudolph, I., Mendoza, G., Zapata, A.M., Díaz-Cruz, S., Barra, R., Ocampo-Duque, W., Paez, M., Darbra, R.M., Eljarrat, E., Barcelo, D., Occurrence of hydrophobic organic pollutants (BFRs and UV-filters) in sediments from South America, *Chemosphere*, **2013**, *92*, 309-316.
- Campone L., Piccinelli A.L., Aliberti L., Rastrelli L., Application of pressurized liquid extraction in the analysis of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in nuts, *J. Sep. Sci.*, **2009**, *32*, 3837–3844
- Chisvert A., Giokas D., Benedé J.L., Salvador A., Environmental Monitoring of Cosmetic Ingredients, Editor(s): Salvador A., Chisvert A., *Analysis of Cosmetic Products*, Elsevier B.V., 2018, Pages 435-540
- Chisvert A., Giokas D.L., Salvador A., Analytical Determination of UV absorbing chemicals in the environment, *Household and Personal Care Today*, **2010**, *4*, 32-37
- CHROMacademy, Reversed Phase Chromatography e-learning module, pp. 93 (www.chromacademy.com) (Προσπελάστηκε 10 Φεβρουαρίου 2019)
- D'Arco G., Fernandez-Franzon M., Font G., Damiani P., Manes J., Analysis of fumonisins B1 B2 and B3 in corn-based baby food by pressurized liquid extraction and liquid chromatography/ tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **2008**, *1209*, 188–194
- Ferreira V.G, Leme G.M., Cavalheiro A.J., and Funari C.S, Online Extraction Coupled to Liquid Chromatography Analysis (OLE-LC): Eliminating Traditional Sample Preparation Steps in the Investigation of Solid Complex Matrices, *Anal. Chem.*, **2016**, *88*, 8421–8427
- Gago-Ferrero P., Díaz-Cruz M.S., Barceló D., Fast pressurized liquid extraction with in-cell purification and analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of UV filters and their degradation products in sediments, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2011a**, *400*, 2195–2204.

- Gago-Ferrero P., Díaz-Cruz M.S., Barceló D., Occurrence of multiclass UV filters in treated sewage sludge from wastewater treatment plants, *Chemosphere*, **2011b**, *84*, 1158-1165
- Giergielewicz-Możajska H., Dąbrowski L., Namieśnik J., Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the Analysis of Environmental Solid Samples — Some Aspects of Theory and Practice, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **2001**, *31*, 149–165
- Hyötyläinen T., Principles, developments and applications of on-line coupling of extraction with chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2007**, *1153*, 14–28
- Mazzoni M., Rusconi M., Valsecchi S., Martins C.P.B., Polesello, S., An On-Line Solid Phase Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Perfluoroalkyl Acids in Drinking and Surface Waters. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, **2015**, *2015*, 1–13
- McCalley D.V., The impact of pressure and frictional heating on retention, selectivity and efficiency in ultra-high-pressure liquid chromatography, *Trends in Analytical Chemistry*, **2014**, *63*, 31–43
- Negreira N., Rodríguez I., Rubí E., Cela R., Optimization of pressurized liquid extraction and purification conditions for gas chromatography–mass spectrometry determination of UV filters in sludge, *J. Chromatogr. A*, **2011b**, *1218*, 211–217
- Osman R., Saim N., Selective Extraction of Organic Contaminants from Soil Using Pressurized Liquid Extraction, *Journal of Chemistry*, Volume 2013, Article ID 357252, 8 pages, (<http://dx.doi.org/10.1155/2013/357252>)
- Richter B.E, Jones B.A, Ezzell J.L, and Porter N.L., Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation, *Anal. Chem.*, **1996**, *68*, 1033-1039
- Richter B.E., Raynie D., Accelerated Solvent Extraction (ASE) and High-Temperature Water Extraction, Editor(s): Pawliszyn J., *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, Academic Press, 2012, Pages 105-115,

- Rodil, R., Moeder, M., Development of a simultaneous pressurised-liquid extraction and clean-up procedure for the determination of UV filters in sediments, *Anal. Chim. Acta*, **2008b**, *612*, 152-159
- Roman I.P., Chisvert A., Canals A., Dispersive solid-phase extraction based on oleic acid-coated magnetic NPs followed by GC-MS/MS for UV filter determination in water samples, *J. Chromatogr. A*, **2011**, *1218*, 2467-2475
- Turner C., Waldebäck M., Principles of pressurized fluid extraction and environmental, food and agricultural applications, Editor(s): Rizvi S., In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries*, Woodhead Publishing, 2013, Pages 39-70
- Sánchez-Camargo A.P., Parada-Alfonso F., Ibáñez E., Cifuentes A., On-line coupling of supercritical fluid extraction and chromatographic techniques, *J. Sep. Sci.*, **2016**, *40*, 213-227
- Urraca, J.L., Marazuela, M.D., Moreno-Bondi, M.C., Analysis of zearalenone and R-zearalenol in cereal and swine feed using solvent accelerated solvent extraction and liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal. Chim. Acta*, **2004**, *524*, 175- 183
- Song Y., Song Q., Li J., Shi S., Guo L., Zhao Y., Jiang Y., Tu P., Chromatographic analysis of Polygalae Radix by online hyphenating pressurized liquid extraction, 2016, *Scientific reports*, 6, Article number: 27303
- Zhang Z., Ren N., Li Y.-F., Kunisue T., Gao D., Kannan K., Determination of benzotriazole and benzophenone UV filters in sediment and sewage sludge, *Environ. Sci. Technol.*, **2011b**, *45*, 3909-16.
- Zoccali M., Giuffrida D., Dugo P., Mondello L., Direct online extraction and determination by supercritical fluid extraction with chromatography and mass spectrometry of targeted carotenoids from red Habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.), *J. Sep. Sci.*, **2017**, *40*, 3905-3913
- Δ.Γ. Θεμελής. Αυτοματοποιημένες μέθοδοι χημικής ανάλυσης, University Studio Press. , Θεσσαλονίκη 1999, σελ. 118

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία παρουσιάζει την ανάπτυξη της μεθόδου OLE-LC με σκοπό την εκχύλιση πολύπλοκων δειγμάτων (εδάφη ή ιζήματα) για την ανάλυση μη-πολικών οργανικών ρυπαντών, όπως τα φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας. Στερεά δείγματα εμβολιάστηκαν με αντηλιακές ενώσεις, εκχυλίστηκαν εντός της ροής της υγρής χρωματογραφίας και ανιχνεύθηκαν με ανιχνευτή UV. Επιπροσθέτως αναπτύχθηκε μια μεθοδολογία για την ποσοτική ή ημι-ποσοτική ανάλυση των αντηλιακών, επεκτείνοντας τις δυνατότητες της.

Για να βελτιστοποιηθεί η εκχύλιση μελετήθηκε η επίδραση της πίεσης, της θερμοκρασίας, του pH της κινητής φάσης, η επίδραση της προσθήκης του πληρωτικού υλικού, της ποσότητας του δείγματος και του χρόνου εκχύλισης.

Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η OLE-LC είναι μια δυναμική μέθοδος που προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα. Συγκεκριμένα, η άμεση σύζευξη της διαδικασίας της εκχύλισης με την υγρή χρωματογραφία, προσδίδει απλότητα και ταχύτητα, διότι δεν χρειάζονται πρόσθετες διατάξεις, επιτρέποντας την άμεση ανάλυση δειγμάτων χωρίς προκατεργασία ή την ανάγκη μιας χρονοβόρας διαδικασίας εκχύλισης, μειώνοντας ταυτόχρονα και το κόστος ανάλυσης. Επίσης είναι μια αυτόνομη μέθοδος κατεργασίας δειγμάτων, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις δεν υπήρχε ανάγκη προσαρμογής των πειραματικών συνθηκών.

SUMMARY

This thesis presents the development of an OLE-LC method for the extraction of non-polar organic pollutants, such as UV filters from complex samples (soils or sediments). Solid samples spiked with sunscreens, were extracted into the LC flow and were measured with a UV detector. In addition, a methodology for the quantitative or semi-quantitative analysis of sunscreens was developed, expanding its capabilities.

To optimize the extraction of UV filters from the soil matrix, the effects of pressure, temperature, pH of the mobile phase, dispersion agent, amount of sample and extraction time were studied.

Based on the results obtained, we concluded that OLE-LC is a dynamic method that offers many advantages. In particular, the direct coupling of the extraction process to HPLC offers simplicity and speed, because no additional apparatus is needed, allowing direct analysis of samples without pretreatment or the need for a time-consuming extraction process, while reducing the cost of analysis. It is also a rather autonomous sample preparation method, as in most cases there was no need to adapt the experimental conditions.