

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200789





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

62

ΚΩΤΤΗ ΜΕΛΙΝΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΡΥΠΑΝΤΙΚΟΥ
ΦΟΡΤΙΟΥ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΜΕ ΤΕΧΝΙΚΕΣ
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2005



Αρ. ελε.:.....Ι.Ρ.Α.Α. 2887



**Η διατριβή αυτή
είναι αφιερωμένη
στο σύζυγό μου, Βαγγέλη
και
στον γιο μου, Θωμά-Παρασκευά**



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τομέας Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την καθοδήγηση συμβουλευτικής επιτροπής η οποία απαρτίζεται από:

Α) τον Καθηγητή Δρ. Ευμοιρίδη Νικόλαο ως επιβλέποντα καθηγητή,

Β) τον Καθηγητή Δρ. Αλμπάνη Τριαντάφυλλο και

Γ) τον Λέκτορα Δρ. Νάνο Χρήστο

Το θέμα της διατριβής μου ανέθεσε ο Καθηγητής κος Ευμοιρίδης τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την εξαιρετική καθοδήγησή του σε όλα τα στάδια της διατριβής και την συνεχή ηθική και επιστημονική στήριξη που προσέφερε για την ολοκλήρωση της διατριβής αυτής.

Επίσης ευχαριστώ θερμά τους :

Α) κύριο Αλμπάνη Τριαντάφυλλο, Καθηγητή στον τομέα Βιομηχανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων για τις χρήσιμες συμβουλές, παρατηρήσεις, υποδείξεις του κατά την διάρκεια της διατριβής.

Β) κύριο Νάνο Χρήστο, Λέκτορα στον τομέα Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων για την πολύτιμη βοήθεια και συμπαράσταση για την εκπόνηση της διατριβής.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω την πολύτιμη βοήθεια από τον Δρ. Βλεσσίδα Αθανάσιο, Επίκουρο Καθηγητή στον τομέα Αναλυτικής Χημείας στην αντιμετώπιση τεχνικών προβλημάτων και στην συνεργασία του για την συγγραφή της δημοσίευσης.

Επίσης, ευχαριστώ τον κύριο Λύκα Αριστεΐδη, Επίκουρο καθηγητή του Τμήματος Πληροφορικής στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τα Νευρωνικά δίκτυα και

Τους συναδέλφους μου από το εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, τον Δρ. Θανασούλια Νικόλαο και τον κύριο Παρίση Νικόλαο, μεταπτυχιακό φοιτητή για την βοήθειά τους στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων με την Ανάλυση σε συστάδες.

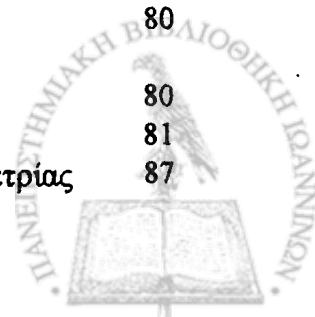


ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ	
	ΕΙΣΑΓΩΓΗ
	1
1.1	Το νερό και η σημασία του
	1
1.1.1	Αστικά λύματα
	2
1.1.2	Βιομηχανικά και γεωργικά απόβλητα
	2
1.1.3	Νοσοκομειακά λύματα
	7
1.2	Κατηγορίες ενώσεων που περιέχονται στα υγρά απόβλητα
	7
1.3	Ποιοτικός χαρακτηρισμός των νερών
	19
1.3.1	Κυριότερες παράμετροι χαρακτηρισμού της ποιότητας των νερών
	19
1.3.2	Χαρακτηρισμός των νερών με χρήση της φασματοφωτομετρίας στην περιοχή του υπεριώδους
	22
1.3.2.1	Πληροφορίες για το οργανικό υλικό των νερών
	22
1.3.2.2	Μέθοδοι γρήγορου χαρακτηρισμού των νερών με τη βοήθεια του φάσματος στην περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας και τεχνικών κλασμάτωσης
	24
1.4	Αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού που εφαρμόστηκαν για τη διάκριση των διαφόρων ειδών αποβλήτων
	27
1.4.1	Συμβολή της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους στην κλασμάτωση των αποβλήτων
	27
1.4.1.1	Ενώσεις χουμικού τύπου
	27
A	Περιγραφή
	27
B	Παράγοντες που επηρεάζουν τη συμπεριφορά των χουμικών ενώσεων
	29
Γ	Μέθοδοι ανίχνευσης των χουμικών ενώσεων
	30
Δ	Κλασμάτωση των χουμικών ενώσεων με τη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους
	31
1.4.1.2	Πεπτίδια
	32
A	Περιγραφή και ιδιότητες
	32
B	Μέθοδοι ανίχνευσης των πεπτιδίων
	33
Γ	Παράγοντες που επηρεάζουν τη δομή των πεπτιδίων
	33
Δ	Μη ιδανική SEC
	34
1.4.1.3	Εφαρμογές της SEC σε διαχωρισμούς άλλων μεγαλομορίων
	34
1.4.2	Συμβολή της τεχνικής της διαπίδυσης στην κλασμάτωση των αποβλήτων
	36
1.4.2.1	Εφαρμογές της διαπίδυσης σε περιβαλλοντικά δείγματα
	36



	1.4.2.2	Χαρακτηρισμός του οργανικού υλικού με τις τεχνικές υπερδιήθησης και ανάστροφης ώσμωσης	38
	1.4.3	Συμβολή της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης με ανιχνευτή πολλαπλών διόδων στην κλασμάτωση των αποβλήτων	41
1.5		Δειματοληψία- Συντήρηση- Χρόνος παραμονής των δειγμάτων αποβλήτων	43
	1.5.1	Αντιπροσωπευτικό δείγμα	43
	1.5.2	Δοχεία δειγμάτων	44
	1.5.3	Τρόποι συντήρησης των δειγμάτων	45
	1.5.4	Χρόνοι συντήρησης των δειγμάτων	45
1.6		Χημειομετρικές μέθοδοι	46
	1.6.1	Αναγνώριση αποτυπώματος συμπεριφοράς	47
	1.6.1.1	Τεχνικές προεπεξεργασίας	49
	1.6.1.2	Μέθοδοι παρουσίασης	49
	1.6.1.3	Μάθηση χωρίς επίβλεψη	49
	1.6.1.4	Μάθηση με επίβλεψη	50
	1.6.1.5	Διασταυρούμενη πιστοποίηση	51
	1.6.2	Τεχνητά νευρωνικά δίκτυα	51
	1.6.2.1	Νευρωνικοί υπολογισμοί	51
	1.6.2.2	Λειτουργία του βιολογικού συστήματος	52
	1.6.2.3	Βασικές αρχές νευρωνικών δικτύων	53
	1.6.2.4	Εφαρμογές των νευρωνικών δικτύων	56
	1.6.2.5	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των ΤΝΔ	57
	1.6.2.6	Τρόπος κατασκευής των ΤΝΔ	58
	1.6.2.7	Κατηγορίες των ΤΝΔ με βάση τη δομή τους	59
	1.6.2.8	Εκπαίδευση των ΤΝΔ	60
	1.6.2.9	Δίκτυα πρόσθιας τροφοδότησης	61
	1.6.3	Γραμμική συμμεταβολή	62
	1.6.3.1	Απλή γραμμική συμμεταβολή	62
	1.6.3.2	Πολλαπλή γραμμική συμμεταβολή	69
	1.6.4	Ανάλυση σε συστάδες	71
	1.6.4.1	Ιεραρχική Ανάλυση σε συστάδες	72
	A	Κριτήρια ταξινόμησης των παρατηρήσεων	72
	A1	Επιλογή των μεταβλητών	72
	A2	Μέτρηση της απόστασης ή ομοιότητας των τιμών	72
	A3	Τυποποίηση των τιμών	73
	B	Σχηματισμός των συστάδων	74
	1.6.4.2	Διαδικασία της Ανάλυσης σε συστάδες	76
	1.6.4.3	Εφαρμογές της Ανάλυσης σε συστάδες στη Χημεία	77
		Σκοπός της διδακτορικής διατριβής	78
		Μεθοδολογία επίτευξης του στόχου	79
		ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ	80
		ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	80
2.1		Δειματοληψίες και τρόποι συντήρησης των δειγμάτων	80
2.2		Λήψη των φασμάτων	80
2.3		Ποιοτικός χαρακτηρισμός των δειγμάτων	81
2.4		Επεξεργασία των δεδομένων με χρήση χημειομετρίας	87



	A	Νευρωνικά δίκτυα	87
	B	Ανάλυσης σε συστάδες	88
2.5		Μέθοδοι διαχωρισμού	88
	A	Διαπίδυση	88
	B	Χρωματογραφία αποκλειμού μεγέθους	92
	Γ	Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης	95
		ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ	
		ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	98
3.1		Φάσματα αποβλήτων σε αντιπαράθεση	98
	3.1.1	Νευρωνικά δίκτυα	98
	3.1.2	Ανάλυση σε συστάδες	100
3.2		Φάσματα διαπίδυσης σε διάφορες φάσεις	106
	3.2.1	Διαπίδυση ενώσεων αναφοράς	106
	3.2.2	Διαπίδυση δειγμάτων	114
	I	Αστικά λύματα	114
	II	Νοσοκομειακά απόβλητα	118
	III	Βιομηχανικά απόβλητα	124
	IV	Επιφανειακά νερά	128
	3.2.3	Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων	133
3.3		Φάσματα της μεθόδου χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους	135
	3.3.1	Συμπεριφορά των ενώσεων αναφοράς	135
	A	Στήλη Sephadex G-25	135
	B	Στήλη Sephadex G-15	140
	3.3.2	Στατιστική εκτίμηση της συμπεριφοράς έκλουσης των ενώσεων αναφοράς στις δύο στήλες με την πολλαπλή γραμμική συμμεταβολή	145
	A	Στήλη Sephadex G-25	145
	B	Στήλη Sephadex G-15	148
	3.3.3	Συμπεριφορά των πραγματικών δειγμάτων	149
	A	Αστικά λύματα	151
	B	Νοσοκομειακά απόβλητα	153
	Γ	Βιομηχανικά απόβλητα	155
	3.3.4	Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων	158
3.4		Υγρή Χρωματογραφία υψηλής πίεσης	160
	3.4.1	Προκαταρκτική μελέτη για την εξέταση της ικανότητας της στήλης να κλασματώσει με κινητή φάση διαφόρων διαλυτών και διαφορετικών μεθόδων έκλουσης αντιπροσωπευτικό δείγμα αστικού λύματος	160
	A	Ισοκρατική έκλυση	161
	A1	Έκλυση με μοναδικό διαλύτη	161
	A2	Έκλυση με δυαδικό σύστημα διαλυτών	164
	i	Μίγματα THF-H ₂ O	164
	ii	Μίγματα THF-ακετονιτρίλιου	168
		Ισοκρατική έκλυση με μίγματα διαλυτών MeOH-H ₂ O, MeCN-H ₂ O και MeCN-MeOH και εφαρμογή της Ανάλυσης σε συστάδες	171
	iii	Μίγματα μεθανόλης-ύδατος	175
	iv	Μίγματα ακετονιτρίλιου-ύδατος	180
	v	Μίγματα ακετονιτρίλιου - μεθανόλης	185



3.4.2		Επιλογή των γνήσιων κορυφών με βάση δύο μεθόδους	191
	B	Βαθμωτή έκλυση στο ίδιο δείγμα	198
3.4.3		Σχόλια για τα φάσματα των κορυφών	203
3.4.4		Ισοκρατική έκλυση βιομηχανικού αποβλήτου	209
	3.4.4.1	Ισοκρατική έκλυση	209
	3.4.4.2	Εφαρμογή της Ανάλυσης σε συστάδες	214
	3.4.4.3	Σύγκριση της διαφορετικότητας χρωματογραφημάτων και φασμάτων των κορυφών του αστικού και του βιομηχανικού λύματος	220
		ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	221
		ΠΕΡΙΛΗΨΗ	222
		SUMMARY	225
		ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	
A		Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης	ΠΕ1
	1	Θεωρία	ΠΕ1
	2	Ορολογία	ΠΕ2
	3	Επιλογή της χρωματογραφικής μεθόδου	ΠΕ3
	4	Θεωρία της χρωματογραφίας - Σχήμα κορυφής	ΠΕ6
	5	Μοντέλα κατακράτησης στη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης	ΠΕ7
	6	Οι επιδράσεις της στατικής φάσης στη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης	ΠΕ8
	7	Οι επιδράσεις της κινητής φάσης στη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης	ΠΕ9
	8	Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης κινητής φάσης-ένωσης	ΠΕ12
	9	Διαλύτες	ΠΕ13
	10	Κλιμακούμενη έκλυση	ΠΕ15
	11	Βελτιστοποίηση της βαθμωτής έκλυσης	ΠΕ16
	12	Ανιχνευτές	ΠΕ17
B		Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους	ΠΕ20
		Θεωρία	ΠΕ20
Γ		Διαδικασίες διαχωρισμού με μεμβράνες	ΠΕ23
	1	Θεωρία	ΠΕ23
	2	Διαπίδυση	ΠΕ25
	3	Θεωρία της ισορροπίας στη διαπίδυση	ΠΕ26
	4	Θεωρία της ισορροπίας Donnan	ΠΕ28
	5	Μεταφορά ιόντων και δυναμικό της μεμβράνης	ΠΕ31
	6	Σύσταση των μεμβρανών	ΠΕ33
	7	Πειραματική διαδικασία διαπίδυσης βάσει πρωτοκόλλου	ΠΕ34
		ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	



ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ



1.1 ΤΟ ΝΕΡΟ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ

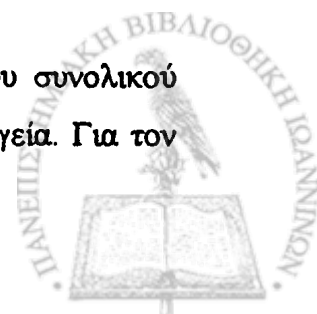
Το νερό είναι ζωτικό στοιχείο για την ζωή και βασική πρώτη ύλη για την ανθρώπινη οικονομία. Ο άνθρωπος μπορεί να εξυπηρετηθεί με πολύ μικρές ποσότητες νερού για την επιβίωσή του, έχει όμως ανάγκη από μεγαλύτερες ποσότητες νερού για την ατομική, την οικιακή, την αστική καθαριότητα και γενικά για πάσης φύσεως δραστηριότητές του.

Στην φύση, το καθαρό νερό της βροχής έρχεται σε επαφή με τα συστατικά της γήινης μάζας και επιβαρύνεται κατά την παραμονή του με διάφορες ουσίες, που διαλύονται ή παρασύρονται από αυτό. Έτσι, το φυσικό νερό παρουσιάζει ποικιλία επιβαρύνσεων (φυσικές, χημικές, ραδιολογικές, βιολογικές-μικροβιολογικές) ανάλογα με τις περιεχόμενες ενώσεις, και τους μικροοργανισμούς.

Οι δύο κύριες πηγές νερού είναι τα επιφανειακά και τα υπόγεια νερά. Επιφανειακά είναι τα νερά από τις λίμνες, τα ποτάμια και την θάλασσα. Περίπου το 80% του νερού που χρησιμοποιείται από τον άνθρωπο προέρχεται από τα επιφανειακά νερά. Τα νερά αυτά περιέχουν κυρίως ανόργανο υλικό το οποίο διαλύεται καθώς το νερό έρχεται σε επαφή με την γη. Υπόγεια νερά είναι αυτά που είναι αποθηκευμένα βαθιά κάτω από την επιφάνεια της γης σε γιγάντιους υδάτινους ταμιευτήρες. Περιέχουν υψηλότερα ποσοστά σε διοξείδιο του άνθρακα λόγω της αποσύνθεσης του οργανικού υλικού.

Ρύπανση του νερού είναι η οποιαδήποτε μεταβολή των φυσικών, χημικών και βιολογικών παραμέτρων του νερού, λόγω της παρουσίας σε αυτό ενώσεων σε ποσότητες που υπερβαίνουν τα ανεκτά όρια για την υγεία των ανθρώπων και εν γένει των ζωντανών οργανισμών.

Επειδή το διαθέσιμο νερό στον πλανήτη είναι ασήμαντο ποσοστό του συνολικού (0,0014%) πρέπει να το προστατέψουμε και παράλληλα την δημόσια υγεία. Για τον



λόγο αυτό τα υγρά απόβλητα πρέπει να υποβληθούν σε απαραίτητες επεξεργασίες καθαρισμού πριν φθάσουν στον τελικό αποδέκτη.

1.1.1 Αστικά λύματα

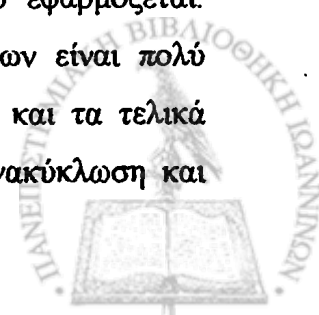
Οικιακά λύματα ή απόνερα είναι τα υγρά απόβλητα που προέρχονται από τις ανθρώπινες δραστηριότητες, δηλαδή από χώρους υγιεινής, μαγειρεία, πλυντήρια και γενικά από την καθαριότητα κατοικιών, γραφείων, καταστημάτων, ιδρυμάτων, τουριστικών εγκαταστάσεων, μέσων μεταφοράς, κλπ.. Όταν τα οικιακά λύματα αναμιχθούν με τα βιομηχανικά ή/και με τα όμβρια νερά (τα νερά της βροχής) ονομάζονται αστικά λύματα.^{1,2} Κύριο συστατικό των αστικών λυμάτων είναι το νερό, που φέρει διάφορες ενώσεις οι οποίες θα αναφερθούν εκτενώς παρακάτω. Οι ενώσεις αυτές ρυπαίνουν το νερό και το καθιστούν ακατάλληλο για χρήσεις όπως είναι το πόσιμο νερό.

1.1.2 Βιομηχανικά και γεωργικά απόβλητα

Είναι τα υγρά απόβλητα των εγκαταστάσεων που δημιουργούνται κατά την παραγωγική διεργασία και μπορεί να περιέχουν υπολείμματα των υλών που χρησιμοποιούνται σε κάθε μια από αυτές (πτηνοτροφικές, κτηνοτροφικές, ιχθυοτροφικές ή γεωργικές), εκτός από τα λύματα του προσωπικού των.

Τα απόβλητα από τις γεωργικές δραστηριότητες φέρουν συνήθως λιπάσματα και φυτοφάρμακα. Η ρύπανση που προκαλούν στα νερά οδηγεί στον ευτροφισμό. Η ρύπανση αυτή φτάνει στα επιφανειακά νερά μέσω της επιφανειακής απορροής με τα νερά της βροχής, ή με την επικοινωνία με τα υπόγεια νερά που εν τω μεταξύ έχουν ρυπανθεί από τη στράγγιση των νερών άρδευσης των αγρών.

Τα υγρά βιομηχανικά απόβλητα μεταφέρουν κατά κανόνα σημαντικό ρυπαντικό φορτίο, που σε αντίθεση με τα αστικά λύματα, παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία τόσο από κλάδο σε κλάδο βιομηχανίας, όσο και μεταξύ των παρόμοιων ακόμη βιομηχανιών ανάλογα με τις πρώτες ύλες και την παραγωγική διαδικασία που εφαρμόζεται. Συνεπώς, τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των βιομηχανικών αποβλήτων είναι πολύ μεταβλητά ανάλογα με το είδος της βιομηχανίας, τις πρώτες ύλες και τα τελικά προϊόντα, την παραγωγική διεργασία, την ανάκτηση υλικών, την ανακύκλωση και



επαναχρησιμοποίηση των αποβλήτων και τέλος την κατάλληλη οργάνωση για τον περιορισμό των διαρροών και απωλειών και την εξοικονόμηση των υδατικών πόρων.

Παρακάτω παρουσιάζονται ³ τα βασικά ποιοτικά χαρακτηριστικά διαφόρων κατηγοριών βιομηχανικών αποβλήτων:

Γαλακτοβιομηχανίες

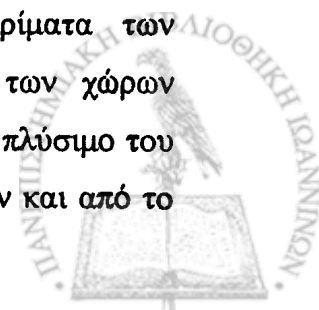
Οι βιομηχανίες αυτές κατατάσσονται στις ακόλουθες μονάδες: παστερίωσης και εμφιάλωσης, παραγωγής τυριού, κρέμας και βουτύρου, συμπυκνωμένου γάλακτος, σκόνης γάλακτος, γιαουρτιού και παγωτών. Τα υγρά απόβλητά τους προέρχονται από την επεξεργασία της πρώτης ύλης (παραλαβή, αποθήκευση, διαύγαση, παστερίωση) κατά την οποία εμφανίζονται απώλειες γάλακτος (λόγω υπερχειλίσεων, διαρροών, αφρισμού), από την διάθεση τυρογάλακτος, βουτυρογάλακτος και από την πλύση των χώρων παραγωγής και εξοπλισμού (χρησιμοποιείται νιτρικό οξύ, φωσφορικό οξύ), των δεξαμενών αποθήκευσης καθώς και των βυτιοφόρων μεταφοράς της πρώτης ύλης. Τα νερά ψύξης των δεξαμενών επίσης συνεισφέρουν στον όγκο των υγρών αποβλήτων. Το μεγαλύτερο πρόβλημα που παρουσιάζουν τα απόβλητα των βιομηχανιών αυτών είναι ο ορός γάλακτος (τυρόγαλα) το οποίο έχει πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και σάκχαρα. Επίσης άλλες ενώσεις-ρυπαντές είναι τα χλωριούχα άλατα (λόγω άλμης), τα φωσφορικά άλατα, τα στερεά και άλλα αζωτούχα συστατικά.

Βιομηχανίες επεξεργασίας και συντήρησης φρούτων και λαχανικών

Τα υγρά απόβλητα από τις μονάδες αυτές προέρχονται από την αποφλοιώση των καρπών, την πλύση των, την συμπύκνωση των χυμών, την αποστείρωση, από την ψύξη των δοχείων κονσερβοποίησης, από την πλύση των δαπέδων και του εξοπλισμού. Τα απόβλητα περιέχουν συνήθως υπολείμματα φυτοφαρμάκων, επιπλέοντα στερεά, σάκχαρα, κυτταρίνη.

Βιομηχανίες παραγωγής, επεξεργασίας και συντήρησης κρέατος

Στα χοιροτροφεία τα υγρά απόβλητα προέρχονται από τα εκκρίματα των εκτρεφόμενων ζώων και τον υγρό καθαρισμό των δαπέδων και των χώρων σταβλισμού. Τα απόβλητα των σφαγείων αυτών περιέχουν αίμα, από το πλύσιμο του σφάγιου, την υγρή μεταφορά των εδώδιμων και μη εδώδιμων εντοσθίων και από το



πλύσιμο του δαπέδου και του εξοπλισμού. Άλλα συστατικά είναι τα λίπη, αζωτούχες ενώσεις, αιωρούμενα στερεά (από σάρκες, τρίχες) και άλατα όπως φωσφορικά, χλωριούχα.

Βιομηχανίες επεξεργασίας και συντήρησης βρώσιμων αλευμάτων και προϊόντων αλευμάτων

Τα υγρά απόβλητα προέρχονται από τις διεργασίες πλυσίματος, την υγρή μεταφορά εντοσθίων και από το πλύσιμο του δαπέδου και του εξοπλισμού. Ο μεγαλύτερος όγκος των αποβλήτων προκύπτει από τα υδροφόρα στάδια: την υδραυλική εκφόρτωση της πρώτης ύλης, το πλύσιμο και την υδρομεταφορά της πρώτης ύλης.

Βιομηχανίες παραγωγής λαδιού

Χωρίζονται σε ραφινερίες, πυρηνελαιουργεία, σπορελαιουργεία και ελαιοτριβεία. Στις ραφινερίες τα υγρά απόβλητα προέρχονται από τις διεργασίες εξευγενισμού (ραφινάρισματος) σπορελαίων και ελαιολάδων και κυρίως από το στάδιο της εξουδετέρωσης.

Τα πυρηνελαιουργεία έχουν απόβλητα χαμηλού υδραυλικού και ρυπαντικού φορτίου. Προέρχονται κυρίως από τον διαχωριστή εξανίου-νερού, από τις απομαστεύσεις πύργων ψύξης και λεβητοστασίου.

Τα σπορελαιουργεία δεν παράγουν υγρά απόβλητα παρά μόνο στερεά (κοτσάνια, ξένες ύλες, κλπ.), που προέρχονται από τον καθαρισμό της πρώτης ύλης που γίνεται στα ελαιουργεία.

Στα ελαιοτριβεία τα απόβλητα προέρχονται από το στάδιο έκπλυσης των ελαίων και από το στάδιο του φυγοκεντρικού διαχωρισμού. Τα στερεά απόβλητά τους προέρχονται από τους ελαιοπυρήνες που προωθούνται στα πυρηνελαιουργεία για παραγωγή πυρηνέλαιου.

Τα υγρά απόβλητα των βιομηχανιών αυτών περιέχουν υψηλά ποσοστά σε βιοαποικοδομήσιμες ενώσεις (λιπαρά οξέα, σάπωνες), κυτταρίνη, αιωρούμενα στερεά και ρητινώδη υλικά.

Βιομηχανίες παραγωγής προϊόντων αλευρόμυλων, παραγωγής αμύλου και προϊόντων αμύλου

Τα υγρά απόβλητά τους προέρχονται από την υγρή άλεση του καλαμποκιού και συνεπώς θα περιέχουν άμυλο.



Βιομηχανίες παραγωγής ειδών διατροφής

Οι ζαχαροβιομηχανίες παράγουν υγρά απόβλητα από τα στάδια επεξεργασίας της ζάχαρης, και ιδίως από τη μεταφορά και έκπλυση των τεύτλων και τις διεργασίες εκχύλισης. Οι βιομηχανίες παραγωγής ζύμης έχουν απόβλητα από τα στάδια διαχωρισμού των στερεών (μαγιά) και από τα υγρά των ζυμωτήρων.

Βιομηχανίες ποτών

Τα ζυθοποιεία και τα αποστακτήρια επεξεργάζονται πρώτες ύλες που περιέχουν στο μεγαλύτερο ποσοστό υδατάνθρακες (άμυλο, σάκχαρα) οι οποίοι υφίστανται ζύμωση και μετατρέπονται σε αιθανόλη. Τα απόβλητα προέρχονται από απώλειες πρώτων υλών, από την πλύση σκευών και εξοπλισμού, από το στάδιο εμφιάλωσης και συσκευασίας, από τα υπολείμματα της παραγωγικής διαδικασίας (γλεύκος, μύρα) και των μιγμάτων τους.

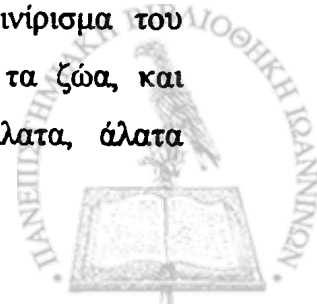
Βιομηχανίες παραγωγής κλωστοϋφαντουργικών υλών και προϊόντων τους

(κλωστοϋφαντουργεία) – Βαφεία – Φινιστήρια - Εριοπλυντήρια

Τα απόβλητα προέρχονται από την επεξεργασία του βαμβακιού, και κυρίως από τον καθαρισμό-απολίπανση, πλύση, λεύκανση και βαφή. Στις βιομηχανίες φινιρίσματος μάλλινων και βαμβακερών υπάρχουν οργανικά χρώματα λόγω της βαφής (χρώματα, ρητίνες). Τα στερεά που απομένουν είναι κυτταρινούχα υλικά (μαλλί, ίνες, νήματα) που προέρχονται από τις διαδικασίες προετοιμασίας, νηματοποίησης βαμβακερών και από τη διαδικασία ύφανσης του βαμβακιού. Τα απόβλητά τους περιέχουν επίσης υψηλά ποσοστά λίπους, ανόργανων αλάτων, διαλυμένων στερεών καθώς και βαρέα μέταλλα.

Βυρσοδεψεία (Κατεργασία και δέψη δέρματος)

Το δέρμα των ζώων αποτελείται κατά το μεγαλύτερο μέρος από πρωτείνες και συγκεκριμένα από κολλαγόνο (σε ποσοστό 85%). Τα απόβλητα των βυρσοδεψείων προέρχονται από το πλύσιμο-μούλιασμα του ακατέργαστου δέρματος, την ασβέστωση και απασβέστωση, υδρόλυση, οξίνιση, δέψη και το φινίρισμα του δέρματος. Περιέχουν σάρκες, τρίχες, λίπη, αίμα, προερχόμενα από τα ζώα, και διαλύτες, απορρυπαντικά, χρώματα, σουλφίδια, ταννίνες, θειικά άλατα, άλατα χρωμίου.



Χαρτοβιομηχανίες

Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούν οι βιομηχανίες αυτές είναι ξύλο, άχυρο, λινάρι, κάνναβι και παλιά χαρτιά. Τα απόβλητά τους περιέχουν κυτταρίνη, σάκχαρα, ταννίνες, λιγνίνη και ανόργανα άλατα. Όσον αφορά τον εμποτισμό της ξυλείας, τα υγρά απόβλητα προέρχονται από τα στραγγίσματα εμποτισμού τα οποία συνήθως επαναχρησιμοποιούνται, από την επεξεργασία του χαρτοπολτού και τις διαδικασίες φινιρίσματος του χαρτιού.

Βιομηχανίες παραγωγής χημικών προϊόντων

Τα υγρά απόβλητά τους προέρχονται από τις παραγωγικές διεργασίες (π.χ. παραγωγή νιτρικού οξέος, παραγωγή αμμωνίας) και από την πλύση του εξοπλισμού.

Βιομηχανίες παραγωγής παρασιτοκτόνων και άλλων αγροχημικών

Τα υγρά απόβλητά τους προέρχονται από τις απώλειες πρώτων υλών, όπως διαλύτες, από τις εκπλύσεις.

Βιομηχανίες παραγωγής σιδήρου, χάλυβα και σιδηροκραμάτων

Τα απόβλητά τους περιέχουν φαινόλες, αμμωνία, κυανιούχα άλατα (δηλητηριώδη) καθώς και ιόντα σιδήρου, μολύβδου, ψευδαργύρου. Προέρχονται από τον καθαρισμό των απαιριών, των καμίνων με υγρές μεθόδους, από την απόρριψη υδάτων έκπλυσης επιφανειών και εξοπλισμού, από την απόρριψη υδάτων καθαρισμού των σιδηρομεταλλευμάτων, από την απομάστευση των υδάτων ψύξεως των εδράνων ελάσεως.

Βιομηχανίες παραγωγής προϊόντων διύλισης (Διυλιστήρια πετρελαίου)

Οι κύριοι ρυπαντές από τα διυλιστήρια είναι υδρογονάνθρακες, φαινόλες, θειούχα άλατα και αιωρούμενα στερεά. Προέρχονται από τις παραγωγικές διεργασίες, τις εξυδατώσεις των δεξαμενών αποθήκευσης του αργού πετρελαίου, των ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων του.



1.1.3 Νοσοκομειακά λύματα

Ειδική κατηγορία λυμάτων είναι τα νοσοκομειακά λύματα. Σε αυτά συνήθως περιέχονται εκτός από τις οργανικές ενώσεις ανθρώπινης προέλευσης, και άλλες ενώσεις όπως είναι για παράδειγμα η φορμαλδεύδη, που χρησιμοποιείται σε υδατικά διαλύματα στην παθολογία, αυτοψία για την διατήρηση οργάνων.

Τα φωτογραφικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στις ακτίνες-Χ, περιέχουν δύο είδους διαλύματα. Το πρώτο διάλυμα περιέχει 5-10% υδροκινόνη, 1-5% καυστικό νάτριο, και λιγότερο από 1 % άργυρο. Το δεύτερο υγρό (εμφάνισης) περιέχει περίπου 45% γλουταραλδεύδη.

Ραδιενεργά αντιδραστήρια μπορεί να χρησιμοποιούνται στην πυρηνική ιατρική, τα οποία πρέπει να συλλέγονται σε ειδικά δοχεία και να επεξεργάζονται πριν διατεθούν σε ειδικούς χώρους.

Επίσης, μεγάλες ποσότητες διαλυτών όπως χλωροφόρμιο, μεθυλενοχλωρίδιο, freon, τριχλωροαιθυλένιο αλλά και ακετόνη, αιθανόλη, ισοπροπανόλη, μεθανόλη, τολουόλιο χρησιμοποιούνται στην παθολογική και ιστολογική εξέταση καθώς και στα εργαστήρια. Συγκεκριμένα, το ξυλόλιο και η αιθανόλη χρησιμοποιούνται στα ιστολογικά και κυτταρολογικά εργαστήρια των τμημάτων ανατομικής παθολογίας. Ενώ τα απόβλητα μεθανόλης και ακετόνης εξατμίζονται ή ρίχνονται στον υπόνομο, τα απόβλητα ξυλολίου χρειάζονται ειδικό χειρισμό αφού θεωρούνται επικίνδυνα αντιδραστήρια.

Η ύπαρξη του υδραργύρου στα νοσοκομειακά απόβλητα, που είναι ρυπαντής, οφείλεται κυρίως σε σπασμένο εξοπλισμό (π.χ. θερμόμετρα)

1.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΑ ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

Τα απόβλητα αστικής, βιομηχανικής, ή οποιασδήποτε άλλης προέλευσης περιέχουν μία πληθώρα ενώσεων-ρυπαντών, κυρίως οργανικών ενώσεων. Στον πίνακα 1 δίνονται οι κυριότερες κατηγορίες ρυπαντών, οι πηγές προέλευσής τους καθώς και η επίδρασή τους στο νερό ⁴.



ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Πηγές και κατηγορίες ρυπαντών στα φυσικά νερά

Είδη ρυπαντών	Πηγές προέλευσης	Επίδραση στο νερό
Ενώσεις που απαιτούν οξυγόνο	Κυρίως οργανικής φύσης, από ανθρώπινα ούρα	Καταναλώνουν διαλυμένο οξυγόνο
Ανθεκτικές στην διάσπαση ενώσεις	Βιομηχανικά απόβλητα, οικιακής χρήσης προϊόντα	Τοξικά στους υδρόβιους οργανισμούς
Ιοί	Ανθρώπινα απόβλητα	Προκαλούν ασθένειες (πιθανόν καρκίνο)
Απορρυπαντικά	Προϊόντα οικιακής χρήσης	Τοξικά στους υδρόβιους οργανισμούς, εμποδίζουν την απομάκρυνση λιπών και ελαίων
Φωσφορικά άλατα	απορρυπαντικά	Θρεπτικές ενώσεις για τα άλγη
Λίπη και έλαια	Μαγειρική, επεξεργασία τροφίμων, βιομηχανικά απόβλητα	Επιζήμια στους υδρόβιους οργανισμούς
Άλατα	Ανθρώπινα περιττώματα, βιομηχανικά απόβλητα	Αυξάνουν την αλατότητα του νερού
Βαρέα μέταλλα	Βιομηχανικά απόβλητα, χημικά εργαστήρια	Τοξικότητα
Μέσα συμπλοκοποίησης	Απορρυπαντικά, βιομηχανικά απόβλητα	Διαλυτοποίηση βαρέων μετάλλων και μεταφορά τους
Στερεά	Όλες οι πηγές	Επιζήμια στην υδρόβια ζωή

Οι κυριότερες κατηγορίες επιβαρύνσεων των φυσικών νερών (στοιχείων, ενώσεων, και σωματιδιακών μορφών) περιγράφονται λεπτομερώς παρακάτω.



Ανιόντα

Τα πιο συνήθη ανιόντα που υπάρχουν στο νερό είναι τα θειικά (SO_4^{2-}), τα χλωριούχα (Cl^-), τα όξινα ανθρακικά (HCO_3^-) και τα ανθρακικά (CO_3^{2-}). Τα θειικά μπορεί να υπάρχουν σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από λίγες μέχρι πολλές χιλιάδες mg/L. Τα χλωριούχα επίσης είναι από τα πιο βασικά ανόργανα ιόντα που υπάρχουν στα νερά και τα απόβλητα. Στο πόσιμο νερό, η αλατώδης γεύση η οποία οφείλεται στα χλωριούχα, ποικίλλει και εξαρτάται από την χημική σύσταση του νερού. Νερά που περιέχουν 250 mg/L χλωριούχων ιόντων μπορεί να έχουν έντονα αλατούχο γεύση εάν το κατιόν είναι νάτριο. Από την άλλη, η τυπική αλατώδης γεύση μπορεί να απουσιάζει ακόμα και αν τα χλωριούχα βρίσκονται σε συγκεντρώσεις 1000 mg/L, όταν κύρια κατιόντα είναι το ασβέστιο και το μαγνήσιο.

Άλλα ανιόντα που μπορεί να υπάρχουν στα απόβλητα είναι τα νιτρικά (NO_3^-) και τα φωσφορικά (PO_4^{3-}).

Μέταλλα

Τα πιο συνήθη μέταλλα που υπάρχουν στα νερά είναι το ασβέστιο, το μαγνήσιο και ο σίδηρος. Άλλα μέταλλα που μπορεί να συμπεριληφθούν είναι το νάτριο, ο ψευδάργυρος, το μαγγάνιο, το αργίλιο, το βάριο, αλλά και βαρέα μέταλλα όπως το κάδμιο, το χρώμιο, ο μόλυβδος, αλλά σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Η τοξικότητα των μετάλλων εξαρτάται από την διαλυτότητά τους, η οποία εξαρτάται από το pH και από την παρουσία των διαφόρων μορφών ανιόντων και άλλων κατιόντων.

Τα μέταλλα διαλύονται στα υπόγεια και επιφανειακά νερά όταν το νερό έρχεται σε επαφή με πετρώματα ή με χώμα που περιέχει τα μέταλλα, συνήθως υπό τη μορφή αλάτων. Επίσης, μπορεί να προέρχονται από τις εκροές των βιολογικών καθαρισμών, των βιομηχανικών μονάδων και άλλες πηγές. Συνήθως, σχηματίζουν δεσμό με τα ανθρακικά ανιόντα (CO_3^{2-}). Υψηλές συγκεντρώσεις σε ασβέστιο και μαγνήσιο κάνουν το νερό σκληρό. Τα κατιόντα αυτά δεν είναι τοξικά και απορροφώνται από τους έμβιους οργανισμούς περισσότερο από τα άλλα μέταλλα. Αν το νερό είναι σκληρό, η τοξικότητα των μετάλλων μειώνεται. Αντιθέτως, σε μαλακό νερό ελαφρά όξινο, τα μέταλλα στις ίδιες συγκεντρώσεις μπορεί να είναι πολύ τοξικά.



Αιωρούμενα στερεά

Οι τρεις κατηγορίες στερεών σωματιδίων που βρίσκονται στα νερά είναι, (α) τα αιωρούμενα στερεά (0,1-10 μm), (β) τα κolloειδή στερεά (1μm-0,1 μm), και (γ) τα «διαλυμένα στερεά» (0,2-1,0 μm). Ιδιαίτερης σημασίας είναι τα κolloειδή σωματiα γιατί έχουν ιδιότητες και συμπεριφορά που επηρεάζεται πολύ από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους, όπως είναι η ειδική επιφάνεια, η υψηλή αναλογία επιφάνεια/πυκνότητα φορτίου. Σχηματίζονται από διάφορες ανόργανες ενώσεις, οργανικές ενώσεις, πρωτεϊνούχα υλικά, από κάποια άλγη και κάποια βακτήρια που αιωρούνται στο νερό σαν μικρά σωματiδια. Τα σωματiδια αυτά, έχουν χαρακτηριστικά τόσο διαλύματος όσο και αιωρήματος, και διασπείρουν το φως. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται φαινόμενο Tyndall. Τα σωματiδια αυτά έχουν σχεδόν το ίδιο μέγεθος με το μήκος κύματος του φωτός.

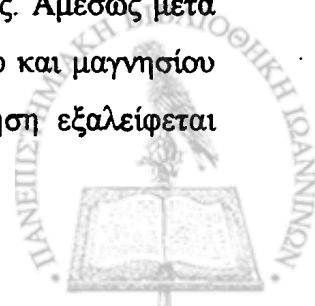
Τα κolloειδή κατατάσσονται ως υδρόφιλα, υδρόφοβα και μικύλλια.

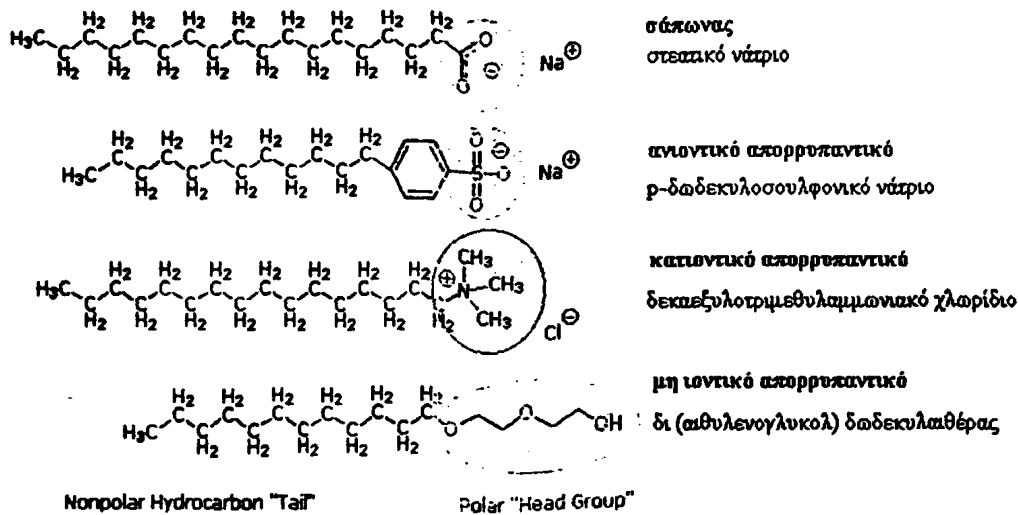
Σάπωνες

Οι σάπωνες είναι άλατα των λιπαρών οξέων μεγάλης αλυσίδας, όπως π.χ. το στεατικό νάτριο $C_{17}H_{35}COONa^+$ (σχήμα 1.1). Η απορρυπαντική δράση τους οφείλεται στην ικανότητά τους να σχηματίζουν γαλακτώματα και να μειώνουν την επιφανειακή τάση του νερού. Παρουσία λιπών, ελαίων και άλλων λιπόφιλων οργανικών ενώσεων το λιπόφιλο τμήμα του σάπωνα (η ουρά) έχει την τάση να διαλύσει το οργανικό υλικό, ενώ το υδρόφιλο τμήμα του (η κεφαλή) παραμένει στο υδατικό μέρος.

Ένα βασικό μειονέκτημα του σαπουνιού προέρχεται από την αντίδρασή του με δισθενή κατιόντα προς σχηματισμό δυσδιάλυτων αλάτων λιπαρών οξέων. Αυτά τα άλατα δεν απορρυπαίνουν. Επιπλέον, τα δυσδιάλυτα άλατα επικάθονται στα ρούχα και στα πλυντήρια. Εάν χρησιμοποιήσουμε αρκετή ποσότητα σαπουνιού, όλα τα δισθενή κατιόντα αντιδρούν με το σαπούνι και έτσι η περίσσεια του σαπουνιού στο νερό θα χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό. Σε άλλες εφαρμογές πάντως πλυσίματος το νερό μπορεί να μαλακώσει απομακρύνοντας τα κατιόντα αυτά ή συμπλοκοποιώντας τα με ενώσεις όπως τα πολυφωσφορικά.

Αν και το σαπούνι έχει καταργηθεί από μέσο πλυσίματος για ρούχα, πιάτα και άλλα υλικά έχει εντούτοις πολλά πλεονεκτήματα από οικολογικής απόψεως. Αμέσως μετά την μεταφορά του στον αγωγό καταβυθίζεται με τα άλατα ασβεστίου και μαγνησίου και έτσι δεν παραμένει στο διάλυμα. Με επιπλέον βιοαποικοδόμηση εξαλείφεται τελείως από το περιβάλλον.





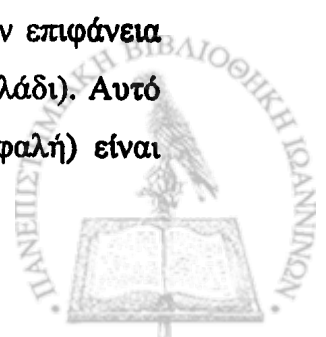
ΣΧΗΜΑ 1.1: Παραδείγματα σάπωνος, ανιοντικού, κατιοντικού και μη ιοντικού απορρυπαντικού

Απορρυπαντικά

Τα συνθετικά απορρυπαντικά δεν σχηματίζουν δυσδιάλυτα άλατα με τα κατίοντα και έχουν καλές απορρυπαντικές ιδιότητες. Έχουν επιπλέον το πλεονέκτημα να είναι άλατα σχετικά ισχυρών οξέων και να μην καταβυθίζονται σε όξινα νερά ως δυσδιάλυτα οξέα.

Αποτελούνται από τρεις βασικούς τύπους: τα ανιοντικά (RSO_3Na^+), τα κατιοντικά ($\text{RMe}_3\text{N}^+\text{Cl}^-$) και τα μη ιοντικά ($\text{R}[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n\text{OH}$) όπου το R κυμαίνεται από 10-20 άτομα άνθρακα και το n μπορεί να κυμαίνεται μέχρι χιλιάδες. Στο σχήμα 1.1 δίνονται παραδείγματα των τριών τύπων των απορρυπαντικών.

Το βασικό συστατικό των απορρυπαντικών είναι το τασιενεργό μέσο που δρα ως ενισχυτής της απορρυπαντικής δράσης του νερού. Συγκεντρώνονται στην επιφάνεια του νερού με αέρια, στερεά (σκόνη) και μη αναμίξιμα με το νερό υγρά (λάδι). Αυτό το πετυχαίνουν γιατί έχουν αμφίφιλη δομή, το ένα μέρος τους (η κεφαλή) είναι



πολική ή ιοντική ομάδα με ισχυρή συγγένεια στο νερό ενώ το άλλο μέρος τους (η ουρά) είναι υδρόφοβο.

Η παρουσία αιθερικών οξυγόνων στα μη ιοντικά απορρυπαντικά επιτρέπει την σύμπλεξή τους με κατιόντα και διευκολύνει την περαιτέρω διαλυτοποίηση. Υπάρχουν επίσης απορρυπαντικά που είναι μίγματα ανιοντικών/μη ιοντικών και παράγονται με τον σχηματισμό ενός θεικού εστέρα στην τελευταία υδροξυλομάδα του μη ιοντικού μορίου.

Ένα παράδειγμα ανιοντικού τασιενεργού είναι το δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο (SDS) και υπάρχει σε ποικιλία σαμπουάν, καλλυντικών, καθαριστικών και απορρυπαντικών πλυντηρίου.

Μέχρι το 1960 χρησιμοποιούνταν το ABS (αλκυλοβενζοσουλφονικά) προϊόν σουλφούρωσης ενός αλκυλοπαραγωγού του βενζολίου. Αυτό όμως είχε το μεγάλο μειονέκτημα ότι βιοδιασπώνταν πολύ δύσκολα λόγω της διακλαδισμένης αλυσίδας του. Ο έντονος αφρισμός άφηνε υπολείμματα στα ποτήρια και στα συστήματα ανακύκλωσης που χρησιμοποιούνταν για πόσιμο νερό. Ολόκληρη η δεξαμενή αερισμού καλύπτονταν από στρώμα αφρού. Επίσης άλλα προβλήματα από την χρήση του είναι η χαμηλή επιφανειακή τάση του νερού, η μη συσσωμάτωση των κολλοειδών, η επίπλευση των στερεών, η γαλακτωματοποίηση του λίπους, η καταστροφή χρήσιμων βακτηρίων. Όλα αυτά τα προβλήματα οδήγησαν στην αντικατάσταση του ABS από το πιο γραμμικό LAS (γραμμικά αλκυλοσουλφονικά).

Το LAS (α-βενζοσουλφονικά) έχει γενική δομή στην οποία ο βενζολικός δακτύλιος βρίσκεται σε οποιοδήποτε σημείο στην αλυσίδα των ατόμων άνθρακα εκτός από τα άκρα. Έτσι είναι πιο βιοδιασπώμενο από το ABS και το έχει αντικαταστήσει ευρέως με θετικές συνέπειες.

Πολλά περιβαλλοντικά προβλήματα καταλογίζονται στα απορρυπαντικά αλλά αυτό δεν είναι σωστό. Τα βοηθητικά υλικά (builders) που προστίθενται στα απορρυπαντικά είναι η αιτία που προκαλούνται προβλήματα. Τα υλικά αυτά προσροφούν τα κατιόντα, καθιστούν το διάλυμα αλκαλικό και βελτιώνουν τη δράση του τασιενεργού. Ένα εμπορικό απορρυπαντικό σε σκόνη περιέχει περίπου 10-30% τασιενεργή ουσία. Πολλά απορρυπαντικά περιέχουν πολυφωσφορικά με την μορφή συμπλόκου με ασβέστιο. Άλλες ενώσεις είναι ιονανταλλάκτες, αλκάλια (ανθρακικό νάτριο), πυριτικά άλατα του νατρίου, αμιδικοί σταθεροποιητές αφρού, καρβοξυλομεθυλοκυτταρίνη, ένζυμα, αρώματα, χρωστικές.



Έχει κερδίσει έδαφος η χρήση ενζύμων (ιδίως λιπάσες που διασπούν π.χ. τα τριγλυκερίδια σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα και οι κυτταρινάσες) στα απορρυπαντικά αντικαθιστώντας τη χλωρίνη και τα φωσφορικά με τις γνωστές περιβαλλοντικές συνέπειες.

Άλλες κατηγορίες ενώσεων που χρησιμοποιούνται ως απορρυπαντικά είναι οι εννυλοφαινόλες, οι οκτυλοφαινόλες, τα αλκυλο και αρυλο σουλφονικά άλατα, οι τριαιθανολαμίνες, οι πολυαιθυλενογλυκόλες, οι εστέρες φωσφορικού οξέος, οι εστέρες σουκρόζης.

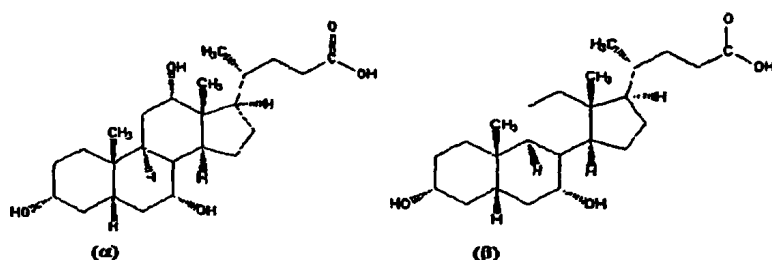
Λιπίδια

Τα λιπίδια είναι ενώσεις που εκχυλίζονται από το φυτικό ή ζωικό ιστό με οργανικούς διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο, διαιθυλαιθέρας, το τουλουόλιο. Τα πιο συνηθισμένα λιπίδια είναι τα λίπη και τα έλαια που αποτελούνται από τριγλυκερίδια (σχηματίζονται από την γλυκερίνη $\text{CH}_2(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{OH})$ και μεγάλης αλυσίδας ατόμων άνθρακα λιπαρά οξέα $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$). Ακόμη άλλες ενώσεις στην κατηγορία αυτή είναι οι κηροί, η χοληστερόλη, και κάποιες βιταμίνες και ορμόνες. Τροφές όπως το βούτυρο και τα εδώδιμα λάδια είναι επίσης λιπίδια.

Μία σημαντική κατηγορία λιπιδίων είναι τα φωσφορογλυκερίδια που είναι συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Οι κηροί επίσης είναι εστέρες λιπαρών οξέων. Η αλκοόλη στον κηρό δεν είναι η γλυκερίνη αλλά μία μεγάλης αλυσίδας αλκοόλη.

Τα στεροειδή είναι λιπίδια που βρίσκονται σε ζώντες οργανισμούς. Ένα παράδειγμα αποτελεί η χοληστερίνη η οποία έχει τη δομή δακτυλίου. Η αποικοδόμηση των στεροειδών δίνει στα ούρα το χαρακτηριστικό χρώμα. Τα στεροειδή βρίσκονται στα άλατα της χολής τα οποία παράγονται από το ήπαρ και έπειτα βγαίνουν στα έντερα. Τα οξέα της χολής είναι φυσιολογικά στεροειδή, παράγωγα της χοληστερόλης και περιέχουν πολικά και μη πολικά μέρη. Παραδείγματα τέτοιων οξέων είναι το χολικό και το δεοξυχολικό οξύ τα οποία όταν συζεύγνυνται με την γλυκίνη ή την ταυρίνη (παραπροϊόν του μεταβολισμού της κυστεΐνης) δίνουν ταυροχολικά, γλυκοχολικά και ταυροδεοξυχολικά άλατα. Παραδείγματα τέτοιων οξέων δίνονται στο σχήμα 1.2.



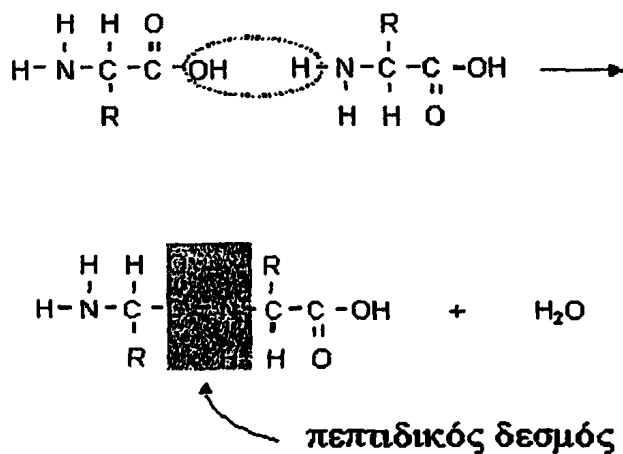


ΣΧΗΜΑ 1.2: Χολικό οξύ (α) και δεοξυχολικό οξύ (β)

Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι οργανικές ενώσεις περιέχουσες άζωτο, και είναι δομικές μονάδες για τους ζώντες οργανισμούς. Παράγονται κατά την σύνδεση αμινοξέων με πεπτιδικούς δεσμούς, όπως φαίνεται στο σχήμα 1.3. Τα αμινοξέα είναι οργανικές ενώσεις που στα άκρα τους καταλήγουν σε ελεύθερες καρβοξυλομάδες (-COOH) και αμινομάδες (-NH₂). Είναι πολυμερή ή μακρομόρια αμινοξέων που περιέχουν από 40 μέχρι και χιλιάδες αμινοξέα. Μικρότερα μόρια από τις πρωτεΐνες είναι τα πολυπεπίδια. Τα φυσικά απαντούμενα πεπίδια αποτελούνται από δύο αμινοξέα μέχρι και πολλές χιλιάδες αμινοξέα.

Οι βασικοί τύποι των πρωτεϊνών δίνονται στον πίνακα 2.



ΣΧΗΜΑ 1.3: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού



ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Βασικοί τύποι πρωτεϊνών

Τύπος πρωτεΐνης	Παράδειγμα	Λειτουργία και Χαρακτηριστικά
Θρέψη	Καζεΐνη (γάλα)	Θρεπτική πηγή. Απαραίτητη για την σωστή λειτουργία του οργανισμού
Αποθήκευση	Φερριτίνη	Αποθήκευση του σιδήρου στους ζωικούς ιστούς
Δομή	Κολλαγόνο, κερατίνη	Δομικά και προστατευτικά συστατικά των οργανισμών
Κίνηση	Ακτίνη, μυοσίνη (μυϊκός ιστός)	Δυνατές, ινώδεις πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την κίνηση
Μεταφορά	Αιμογλοβίνη	Μεταφέρει οργανικές και ανόργανες ενώσεις στο αίμα
Άμυνα	-	Αντισώματα για την προστασία του οργανισμού από τους ιούς
Ρύθμιση	Ινσουλίνη	Ρυθμίζει τον μεταβολισμό του σακχάρου δεσμεύοντας θέσεις μέσα στα κύτταρα ή στις κυτταρικές μεμβράνες
Ένζυμα	Ακετυλοχολινεστεράση	Καταλύουν βιοχημικές αντιδράσεις

Μερικές πρωτεΐνες αποτελούνται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα, ενώ άλλες, οι επονομαζόμενες πρωτεΐνες πολύ-υπομονάδων έχουν δύο ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς που δεν είναι ομοιοπολικοί. Οι αλυσίδες αυτές μπορεί να είναι όμοιες ή διαφορετικές. Η αιμογλοβίνη για παράδειγμα με 574 υπομονάδες (residues) έχει τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες δύο όμοιες άλφα αλυσίδες και δύο όμοιες β αλυσίδες, όλες ενωμένες με αλληλεπιδράσεις μη ομοιοπολικές.

Λίγες μόνο πρωτεΐνες αποτελούνται από δύο ή περισσότερες υπομονάδες που συνδέονται ομοιοπολικά (π.χ. η ινσουλίνη). Οι δύο υπομονάδες της ινσουλίνης



συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς). Σε τέτοιες περιπτώσεις, τα ξεχωριστά πολυπεπτίδια δεν θεωρούνται υπομονάδες, αλλά απλά αλυσίδες.

Ένζυμα

Τα ένζυμα είναι ουσίες πρωτεϊνικής φύσεως που έχουν εξειδικευμένες δομές που αλληλεπιδρούν με ειδικές ενώσεις ή κατηγορίες ενώσεων που καλούνται υποστρώματα. Τα ένζυμα δρουν ως καταλύτες που βοηθούν στην πραγματοποίηση βιοχημικών αντιδράσεων, μετά από τις οποίες αναγεννούνται για να συνεχίσουν τη βιολογική τους δράση. Τα ένζυμα είναι γενικά σφαιρικές πρωτεΐνες που διαλύονται στο νερό.

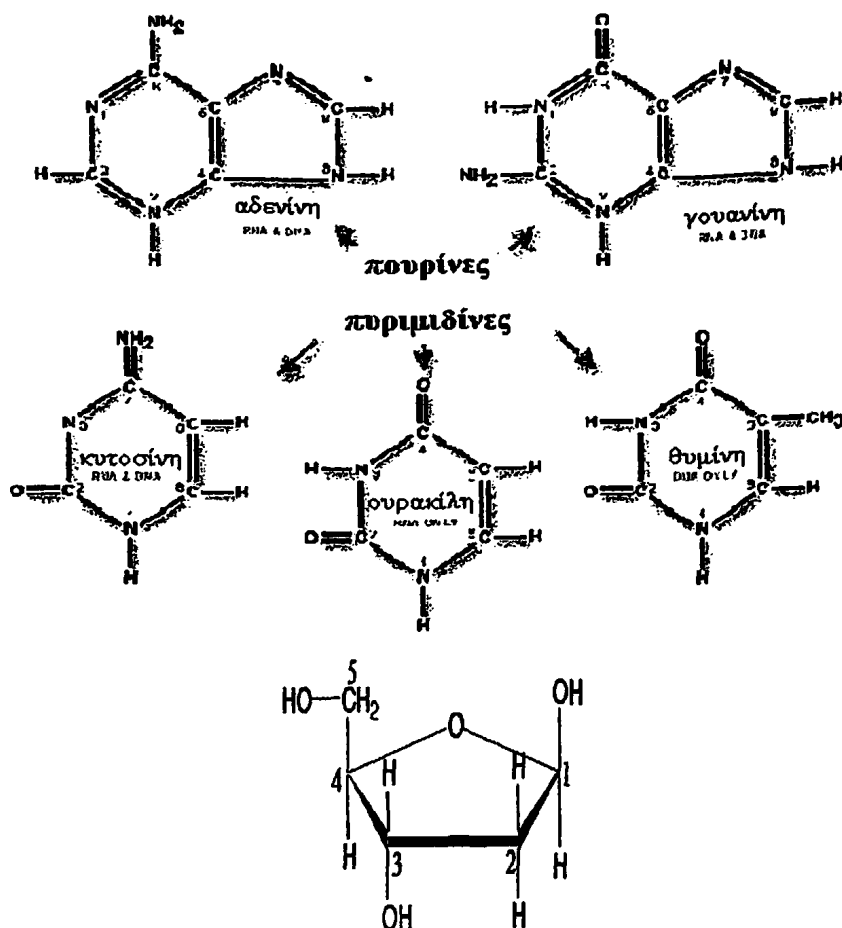
Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες έχουν τον απλό τύπο $C_x(H_2O)_x$ και περιλαμβάνουν μία σειρά ενώσεων που αποτελείται από μονοσακχαρίτες, όπως η γλυκόζη. Οι υψηλού μοριακού βάρους πολυσακχαρίτες, το άμυλο και το γλυκογόνο (ζωικό άμυλο), είναι βιοπολυμερή των απλών σακχάρων. Οι πιο μικροί υδατάνθρακες, γνωστοί ως μονοσακχαρίτες, καλούνται επίσης απλά σάκχαρα. Πιο γνωστός μονοσακχαρίτης είναι η γλυκόζη. Άλλοι μονοσακχαρίτες είναι η φρουκτόζη, η μααννόζη και η γαλακτόζη. Στο σχήμα 1.4 δίνονται οι τύποι κάποιων μονοσακχαριτών. Οι πολυσακχαρίτες πρέπει να μετατραπούν σε γλυκόζη πριν εισαχθούν στο κύτταρο ώστε να δώσουν την απαραίτητη για τον οργανισμό ενέργεια. Φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα είναι από 65 μέχρι 110 mg γλυκόζης σε 100 mL αίματος.

Το άμυλο είναι πολυσακχαρίτης και παράγεται από τα φυτά. Τα ζώα παράγουν το γλυκογόνο. Ο χημικός τύπος του αμύλου είναι $(C_6H_{10}O_5)_n$, όπου n είναι ο αριθμός μορίων γλυκόζης που μπορεί να είναι και μερικές εκατοντάδες. Στις τροφές το βρίσκουμε στο ψωμί, στις πατάτες και γενικά στα δημητριακά.

Η κυτταρίνη περιέχει επίσης μονάδες $C_6H_{10}O_5$. Τα μόριά της είναι τεράστια. Έχει παρόμοια δομή με το άμυλο. Παράγεται από τα φυτά και σχηματίζει το δομικό υλικό των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων. Το ξύλο περιέχει κυτταρίνη σε ποσοστό 60 %, ενώ το βαμβάκι πάνω από 90 %. Οι ίνες της κυτταρίνης εκχυλίζονται από το ξύλο και πέζονται ταυτόχρονα για να παράγουν το χαρτί.





ΣΧΗΜΑ 1.5: Οι αζωτούχες βάσεις και η δεοξυριβόζη-3 που περιέχονται στο DNA και το RNA

Ανθεκτικές στη διάσπαση οργανικές ενώσεις

Οι ανθεκτικές στη διάσπαση οργανικές ενώσεις είναι οι ενώσεις εκείνες που έχουν την μεγαλύτερη σημασία, ειδικά όταν ανιχνεύονται στο πόσιμο νερό. Είναι ενώσεις που δεν μπορούν να διασπασθούν από τους μικροοργανισμούς, και είναι συνήθως αρωματικοί ή χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες. Στη λίστα των ενώσεων αυτών που είναι βιομηχανικής κυρίως προέλευσης, συγκαταλέγονται οι παρακάτω ενώσεις:

Βενζόλιο, βρωμοβενζόλιο, βρωμοχλωροβενζόλιο, βουτυλοβενζόλιο, χλωροφόρμιο, χλωροπυριδίνη, δινιτροτουλούολιο, 2-αιθυλοεξανόλη, μεθυλοδιφαινύλιο, τριχλωροαιθάνιο, τουλουόλιο, κ.α. Πολλές από τις ενώσεις αυτές που έχουν ανιχνευτεί στο πόσιμο νερό, προκαλούν προβλήματα στη γεύση και την οσμή. Οι ενώσεις αυτές δεν απομακρύνονται με τη βιολογική επεξεργασία, και για το λόγο αυτό το νερό που έχει ρυπανθεί από τις ενώσεις αυτές πρέπει να κατεργαστεί με φυσικά και χημικά μέσα, όπως διοχέτευση αέρα, εκχύλιση μέσω διαλύτη, οξονισμός και προσρόφηση σε άνθρακα.



1.3 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΝΕΡΩΝ

Ο χαρακτηρισμός της ποιότητας των νερών γίνεται με φυσικοχημικές παραμέτρους, όπως είναι το pH, το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (COD), το βιοχημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (BOD), ο οργανικός άνθρακας, κατιόντα και ανιόντα, τα βαρέα μέταλλα, λιπαρά οξέα, φαινόλες.

Παρακάτω αναγράφονται αναλυτικά οι κυριότερες παράμετροι χαρακτηρισμού της ποιότητας των νερών^{5,6}.

1.3.1 Κυριότερες παράμετροι χαρακτηρισμού της ποιότητας των νερών

1. pH

Το pH ορίζεται ως ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της ενεργότητας των ιόντων υδρογόνου ($\text{pH} = -\log_{10} a_{\text{H}^+}$). Στα νερά το pH κυμαίνεται περίπου από 6,5-8,0.

2. Χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (COD)

Το COD (Chemical Oxygen demand) είναι η ποσότητα του οξυγόνου που απαιτείται για τη χημική οξείδωση των οργανικών ενώσεων του δείγματος. Η οξείδωση γίνεται με διχρωμικό κάλιο σε πολύ όξινες συνθήκες και καταλήγει στην πλήρη σχεδόν (95%) οξείδωση των οργανικών ενώσεων του δείγματος. Επίσης, οξειδώνονται και ανόργανα ιόντα όπως Fe^{2+} , S^{2-} , Mn^{2+} .

Ενώσεις που δεν οξειδώνονται με τη μέθοδο αυτή είναι κάποιες πτητικές, οι υδρογονάνθρακες, η πυριδίνη και η αμμωνία.

3. Βιοχημικώς Απαιτούμενο Οξυγόνο (BOD)

Το BOD (Biochemical Oxygen Demand) εκφράζει το ποσό του οξυγόνου που απαιτείται από τα βακτήρια και άλλους μικροοργανισμούς για να διασπάσουν (μεταβολίσουν) τις περιεχόμενες ενώσεις του δείγματος. Οι ενώσεις που θα μεταβολιστούν βιοχημικά μπορεί να είναι οργανικές αλλά και ανόργανες όπως τα ιόντα Fe^{2+} , S^{2-} .



4. Αμμώνιο (NH_4^+)

Η αμμωνία είναι προϊόν μικροβιολογικής διάσπασης των πρωτεϊνών. Βρίσκεται υπό την μορφή του αμμώνιου στο pH των δειγμάτων. Στα ακατέργαστα απόβλητα, τα αμμωνιακά ιόντα βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Στα επιφανειακά νερά, οι αυξημένες συγκεντρώσεις σε αμμωνιακά οφείλονται στη χρήση λιπασμάτων.

5. Νιτρώδη (NO_2^-)

Τα νιτρώδη είναι η ενδιάμεση οξειδωτική κατάσταση του αζώτου στα απόβλητα. Η αμμωνία υπό αερόβιες συνθήκες μετατρέπεται σε νιτρώδη (με τα βακτήρια Nitrosomas) και κατόπιν σε νιτρικά (με τα βακτήρια Nitrobacter). Τα νιτρικά ανάγονται μέσω βακτηρίων σε νιτρώδη υπό αναερόβιες συνθήκες.

Τα νιτρώδη παρουσία οξέος αντιδρούν με τις αμίνες, ιδίως τις αρωματικές και σχηματίζουν διαζωνιακά άλατα. Τα διαζωνιακά άλατα αντιδρούν έπειτα με άλλες αρωματικές ενώσεις (όπως είναι το χρωμοτροπικό οξύ) και σχηματίζουν έγχρωμες αζωενώσεις.

6. Νιτρικά (NO_3^-)

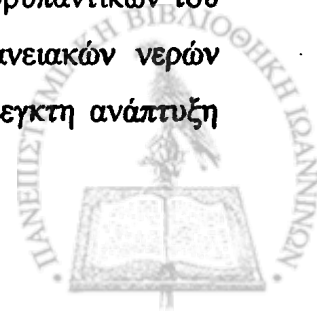
Τα νιτρικά βρίσκονται στα φυσικά νερά σε συγκεντρώσεις από 1 έως 10 mg/L. Υψηλότερες συγκεντρώσεις σε νιτρικά οφείλονται στα λιπάσματα αφού τα νιτρικά δεν προσροφώνται στο έδαφος. Στα ακατέργαστα απόβλητα βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

7. Ολικό άζωτο κατά Kjeldahl

Με την μέθοδο αυτή προσδιορίζεται το άζωτο των πρωτεϊνών, πεπτιδίων, ουρίας, αμινών (ενώσεις δηλαδή όπου το N έχει αριθμό οξείδωσης -3) καθώς και της αμμωνίας του δείγματος. Δεν προσδιορίζεται το άζωτο από τα αζίδια, αζίνες, αζωενώσεις, υδραζόνες, νιτρίλια, νιτροενώσεις, οξίμες, νιτρώδη και νιτρικά

8. Ορθοφωσφορικά

Ο φωσφόρος στα απόβλητα βρίσκεται κυρίως με τη μορφή των ανόργανων φωσφορικών. Τα ορθοφωσφορικά είναι τα κύρια συστατικά των απορρυπαντικών του πλυντηρίου. Αυξημένες συγκεντρώσεις σε φωσφορικά των επιφανειακών νερών προέρχονται από τα λιπάσματα και προκαλούν ευτροφισμό (ανεξέλεγκτη ανάπτυξη αλγών).

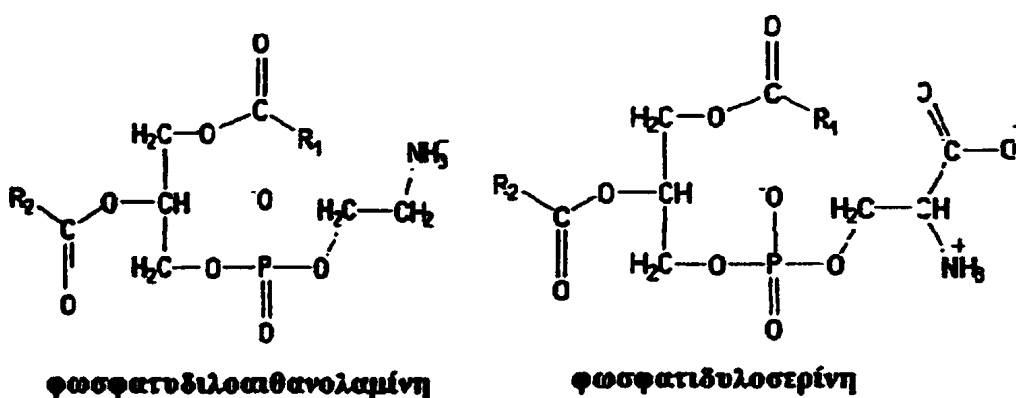


Ο προσδιορισμός τους βασίζεται στην αντίδραση των φωσφορικών με μολυβδαινικά προς σχηματισμό φωσφορομολυβδαινικών τα οποία στην συνέχεια ανάγονται με ενώσεις, όπως η υδραζίνη, το ασκορβικό οξύ προς σχηματισμό ενός ετεροπολυζέως μπλε χρώματος που μετράται φασματοφωτομετρικά.

9. Ολικός φώσφορος

Εκτός από τα ανόργανα φωσφορικά, υπάρχουν τα υδρολύσιμα και τα οργανικώς δεσμευμένα φωσφορικά. Τα πρώτα δύο προέρχονται από τα φωσφορικά άλατα και τη συμπύκνωση των ανόργανων φωσφορικών και περιλαμβάνουν τα μεταφωσφορικά, τα πυροφωσφορικά και τα πολυφωσφορικά. Τα οργανικώς δεσμευμένα φωσφορικά προέρχονται κυρίως από τα ανθρώπινα περιττώματα. Παραδείγματα οργανικώς δεσμευμένων φωσφορικών είναι το DNA, το RNA, τα φωσφολιπίδια (σχήμα 1.6) και η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP).

- Για να προσδιορισθεί ο ολικός φώσφορος προηγείται οξειδωτική υδρόλυση με θέρμανση του δείγματος για να μετατραπούν όλες οι μορφές του φωσφόρου σε ορθοφωσφορικά και να προσδιοριστούν όπως έχει παραπάνω αναφερθεί. Η οξείδωση γίνεται όπως στην μέθοδο Kjeldahl με πυκνό θειικό οξύ.



ΣΧΗΜΑ 1.6: Παραδείγματα φωσφολιπιδίων

10. Αιωρούμενα στερεά

Τα αιωρούμενα στερεά (Total Suspended Solids) προσδιορίζονται με διήθηση συγκεκριμένου όγκου δείγματος και μετέπειτα ξήρανση του ηθμού στους $104 \pm 1^\circ\text{C}$.



1.3.2 Χαρακτηρισμός των νερών με χρήση της φασματοφωτομετρίας στην περιοχή του υπεριώδους

Ανάμεσα στις τεχνικές για την εξέταση της ποιότητας του νερού, έχει κερδίσει έδαφος τα τελευταία χρόνια η φασματοφωτομετρία απορρόφησης στην περιοχή του υπεριώδους (UV). Είναι μία γρήγορη τεχνική που δεν δίνει συγκεκριμένες αναλυτικές πληροφορίες για τα συστατικά του νερού, αλλά με την οποία μπορεί να εκτιμηθεί η οργανική ρύπανση⁷, μπορεί να υπολογιστούν παράμετροι, όπως είναι τα νιτρικά, οι φαινόλες, το χρώμιο (VI)^{8,9} και μπορεί να εκτιμηθεί η καταλληλότητα του νερού για διάφορες χρήσεις. Επίσης, μπορεί να βρεθεί ο βιοχημικά διασπώμενος οργανικός άνθρακας σε φυσικά νερά και απόβλητα¹⁰.

Έχει γίνει μελέτη των ποιοτικών χαρακτηριστικών των υγρών αποβλήτων με πρότυπες μεθόδους και με την πολυπαραμετρική μέθοδο βασισμένη στο φάσμα απορρόφησης στην περιοχή του υπεριώδους σε μεταπτυχιακή εργασία¹¹. Η εργασία αυτή έδειξε ότι προσδιορίζονται πολύ καλά τα νιτρικά, και λιγότερο οι παράμετροι COD και BOD που υπολογίζονται με τις μεθόδους αυτές. Άρα, στο φάσμα απορρόφησης οι ενώσεις που κυριαρχούν πρέπει να προσδιοριστούν με την βοήθεια άλλων μεθόδων.

Η μελέτη των πολύπλοκων αυτών δειγμάτων μπορεί να διευκολυνθεί με τον διαχωρισμό των συστατικών τους με διάφορες μεθόδους, για να διευκολυνθεί η μελέτη των πληροφοριών. Έτσι, χρωματογραφικές μέθοδοι όπως η SEC (Size Exclusion Chromatography), HPLC (High Performance Liquid Chromatography), αλλά και μέθοδοι όπως η υπερδιήθηση, η διαπίδυση, η ανάστροφη ώσμωση μπορεί να εφαρμοστούν σε δείγματα νερών για τον διαχωρισμό των οργανικών ενώσεων όπως θα αναφερθούν παρακάτω.

1.3.2.1 Πληροφορίες για το οργανικό υλικό των νερών

Τα περιβαλλοντικά δείγματα περιέχουν οργανικό υλικό γνωστό ως *DOC*, *Dissolved Organic Carbon* (διαλυτός οργανικός άνθρακας), που μπορεί να αποτελείται από διάφορες οργανικές ενώσεις, ανιόντα και κατιόντα. Ο DOC μπορεί να αλλάξει την ανόργανη χημική σύσταση των νερών με τους εξής τρόπους:

α) μεταβάλλοντας το δυναμικό οξειδοαναγωγής κατά redox^{12, 13, 14}



β) αλλάζοντας το pH του νερού ^{15,16}

γ) λαμβάνοντας μέρος σε αντιδράσεις καταβύθισης/επαναδιάλυσης των ανοργάνων ενώσεων ^{17,18,19}

δ) ακινητοποιώντας βαρέα μέταλλα, ραδιονουκλεοτίδια και οργανικές ενώσεις ρυπαντές, αν αυτά συνδεθούν με το οργανικό υλικό. Επίσης, μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα για αντιδράσεις με μικροοργανισμούς, επηρεάζοντας τις συγκεντρώσεις.

Ο διαλυτός οργανικός άνθρακας που περιέχεται στα φυσικά νερά απορροφά φως σε ευρεία κλίμακα μηκών κύματος, ενώ οι περιεχόμενες ανόργανες ενώσεις δεν απορροφούν σε $\lambda > 230$ nm. Οι ομάδες εκείνες που έχουν ηλεκτρόνια τα οποία υφίστανται μεταπτώσεις, όταν το μόριο απορροφά φως, ονομάζονται χρωμοφόρες. Οι χρωμοφόρες ομάδες που είναι υπεύθυνες για την απορρόφηση του φωτός περιλαμβάνουν απλούς ή συζυγείς διπλούς δεσμούς και μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων, όπως αυτά που σχετίζονται με άτομα O, N και αλογόνου ²⁰.

- Στα μόρια της NOM, Natural Organic Matter (φυσική οργανική ύλη), μία μεγάλη πληθώρα χρωμοφόρων ομάδων που απορροφούν στην περιοχή του υπεριώδους ($\lambda < 400$ nm) είναι αρωματικές με διάφορους βαθμούς και τύπους υποκατάστασης, που περιλαμβάνουν κυρίως μόνο-υποκατεστημένες και πόλυ-υποκατεστημένες φαινόλες και ποικίλα αρωματικά οξέα ²¹⁻²⁴. Οι χρωμοφόρες αυτές ομάδες σχετίζονται άμεσα με το χουμικό κλάσμα του NOM. Παρά την ευρέως διαδεδομένη συμφωνία που αφορά την γενική φύση των χρωμοφόρων του NOM και την ισχυρή συσχέτιση που έχει βρεθεί (στις περισσότερες περιπτώσεις) μεταξύ της συγκέντρωσης του NOM και της απορρόφησης των νερών, η ανάλυση του συμπλέγματος ταινιών του UV φάσματος των φυσικών νερών στα επιμέρους φάσματα των περιεχόμενων χρωμοφόρων είναι αδύνατη.

Ο αριθμός των χρωμοφόρων ομάδων είναι πολύ υψηλός, οι συγκεντρώσεις των άγνωστες και καμία από τις χρωμοφόρες δεν κατέχει μοναδικό και εύκολα διακρινόμενο φάσμα απορρόφησης, πλην ελαχίστων εξαιρέσεων. Επιπλέον, η εσωτερική δόνηση και περιστροφή των μορίων καθώς και οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις διευρύνουν τις κορυφές απορρόφησης στο UV φάσμα των μορίων που περιλαμβάνονται στην NOM ²⁵. Ο παράγοντας αυτός μαζί με το γεγονός ότι καθένα από τα δείγματα περιέχει ενώσεις με ευρεία ποικιλία σε χρωμοφόρες ομάδες εξαλείφει οποιαδήποτε διακριτά χαρακτηριστικά και δικαιολογεί την ασάφεια που έχουν τα UV φάσματα των φυσικών νερών.



1.3.2.2 Μέθοδοι γρήγορου χαρακτηρισμού των νερών με την βοήθεια φάσματος στην περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας και διαχωριστικών τεχνικών

Τα επιφανειακά στραγγίσματα προέρχονται από τη δίοδο του βρόχινου νερού μέσα από στερεά απορρίμματα. Σε μία μελέτη ²⁶ που έγινε, 25 είδη στραγγισμάτων διαφόρων προελεύσεων, υποβλήθηκαν σε SEC χρωματογραφία και UV φασματοφωτομετρία. Τα σταθεροποιημένα στραγγίσματα που προέρχονταν κυρίως από οικιακά απορρίμματα, χαρακτηρίζονταν από μονότονα μειούμενο φάσμα, όπου οι ώμοι στα 230 nm και στα 270-280 nm μπορούν να παρατηρηθούν διακριτά και έχουν επίσης μία ελαφρά απορρόφηση πάνω από τα 400 nm. Το SEC χρωματογράφημα έδειξε 2 καλά διακριτές κορυφές που εκλούονταν σε 4 ζώνες (τύπου I, II, III και IV). Στο σχήμα 1.7 φαίνονται τα φάσματα των κορυφών που ελήφθησαν.

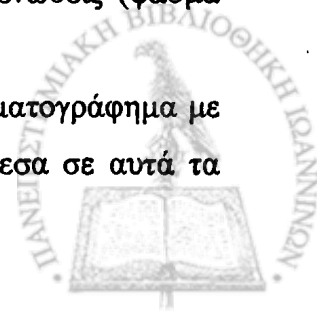
Τα τύπου I φάσματα έχουν μονότονο σχήμα και χαρακτηρίζονται από χαμηλή αναλογία απορρόφησης μεταξύ της αρχής και του τέλους του φάσματος. Τυχόν όμως ή κορυφή στα 270-280 nm μπορεί να οφείλεται στις λιγνίνες που χαρακτηρίζουν τις χουμικές ενώσεις.

Τα τύπου II φάσματα είναι κοίλα, βαθουλωτά και έχουν απορρόφηση που γρήγορα μειώνεται μετά τα 210 nm. Μερικά από αυτά έχουν έναν ελαφρύ ώμο στα 270-280 nm. Τα φάσματα αυτά μπορεί να αντιπροσωπεύουν λιπαρά οξέα.

Τα τύπου III φάσματα που εμφανίζονταν συνήθως αμέσως μετά τα τύπου II, παρουσιάζουν έναν ώμο μεταξύ 220-240 nm και σημαντική απορρόφηση πάνω από τα 300 nm, και μερικές φορές μία μικρή κορυφή ή έναν ώμο στα 270-280 nm. Τα φάσματα αυτά εμφανίζονται σε όλα σχεδόν τα δείγματα (αστικά και/ή βιομηχανικά που μοιάζουν με τα αστικά) που έχουν ώμο στα 230 nm είτε φανερό ή δύσκολα διακρινόμενο. Επιπλέον, σε ένα δείγμα που είχε τον ώμο αυτό δύσκολα διακρινόμενο βρέθηκαν φαινολικές ενώσεις (χαρακτηρίζονται από μία κορυφή στα 220 nm και μία δεύτερη στα 275 nm).

Τα πρόσφατα στραγγίσματα από υψηλά βιοδιασπώμενα απόβλητα παρουσίασαν ξεχωριστό φάσμα, όπου φαίνεται ότι υπάρχουν πολυάριθμες ενώσεις. Η μοναδικότητά τους φάνηκε ιδιαίτερα με την SEC χρωματογραφία, όπου αποκάλυψε την ύπαρξη τύπου II ενώσεων, ενώ η συγκέντρωση σε χουμικές ενώσεις (φάσμα τύπου I) φάνηκε να είναι χαμηλότερη.

Τα στραγγίσματα από βιομηχανικά απόβλητα έδειξαν ένα SEC χρωματογράφημα με μία βασική κορυφή και πολύ λίγες μεγαλομοριακές ενώσεις. Ανάμεσα σε αυτά τα



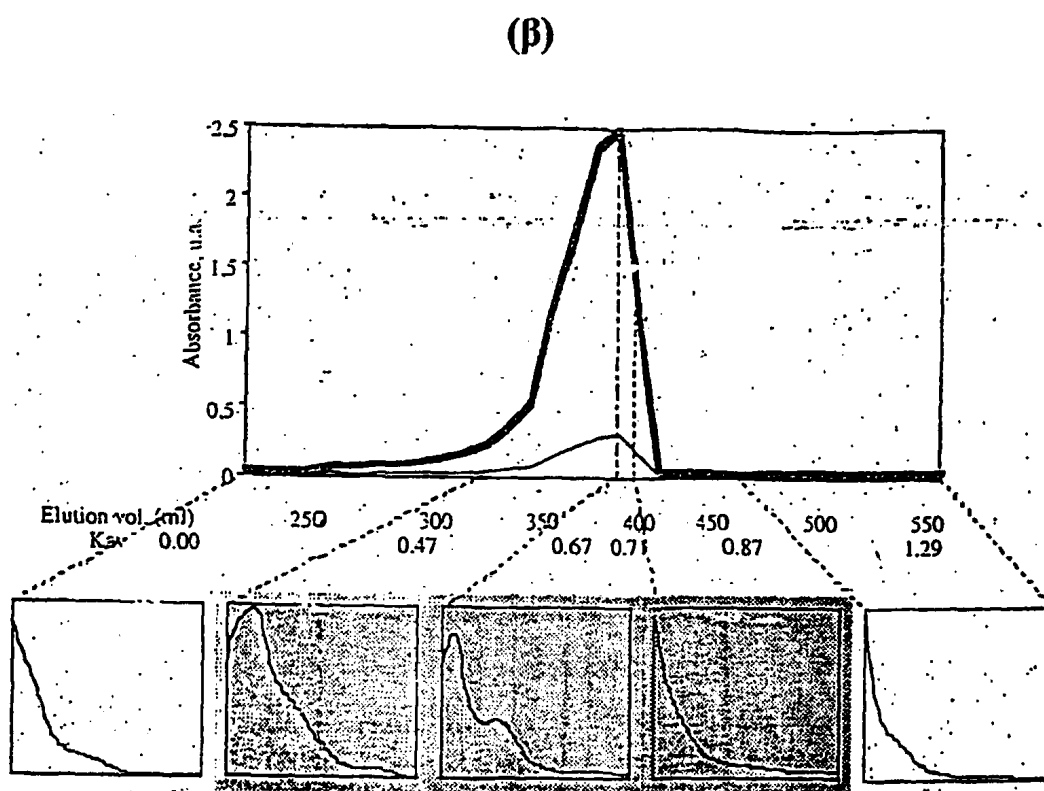
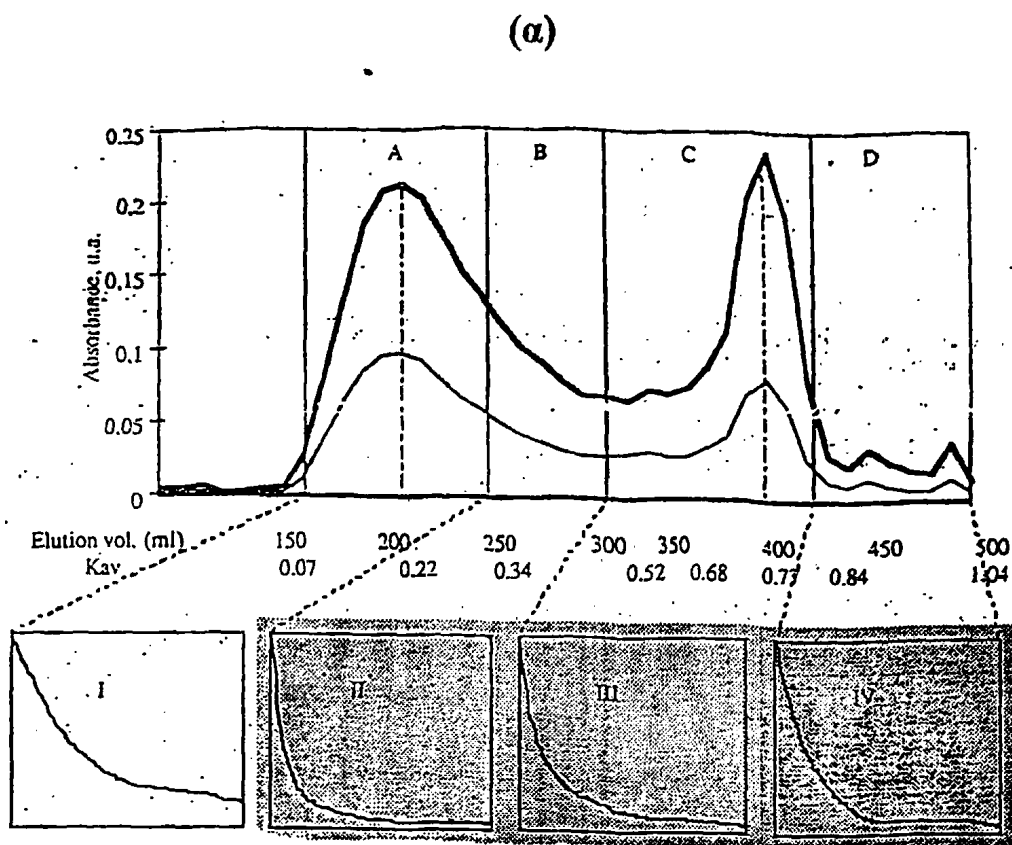
στραγγίσματα είναι πιθανόν να διαφοροποιούνται εκείνα που προέρχονται από τα μη επικίνδυνα σημεία και δίνουν SEC φάσματα κλασμάτων παρόμοια με τα αστικά στραγγίσματα (τύπου I, II, III), προέρχονται πιθανόν από τα χαρτιά, ξύλα, χαρτόνια. Τα στραγγίσματα από τις περιοχές με τα επικίνδυνα απόβλητα (όπως υπολείμματα βαφών, λάσπη βιολογικού καθαρισμού) και τα GPC κλάσματά τους είναι τελείως διαφορετικά από τα UV φάσματα των υπολοίπων στραγγισμάτων.

Σε άλλη μελέτη ²⁷ έγινε σύγκριση μεταξύ αστικού και βιομηχανικού στραγγίσματος βάσει των χημικών χαρακτηριστικών και την κλασμάτωσή τους με SEC χρωματογραφία. Στο αστικό στραγγίσμα στο οποίο ανιχνεύθηκαν διαιθυλοφθαλικοί εστέρες και άλλα φθαλικά παράγωγα, βρέθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό των ενώσεων το 96% με $MB < 3000$ (και από αυτές το 80% με $MB < 1500$) και το 4% με $MB > 70000$. Στο βιομηχανικό στραγγίσμα οι ενώσεις με $MB < 3000$ αποτελούν το 81% και οι ενώσεις με $MB > 70000$ το 4%.

- Με τη χρήση μεθόδων υπερδιήθησης, χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους και υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης διαχωρίστηκαν οι οργανικές ενώσεις ενός στραγγίσματος από ανάμικτα αστικά και βιομηχανικά απόβλητα ²⁸. Το οργανικό φορτίο βρέθηκε χαμηλό και αποτελούνταν από ενώσεις με $MB < 500$, αν και δεν υπήρχαν πτητικά λιπαρά οξέα. Οι ενώσεις που δεν διασπώνται είχαν $MB < 500$ και αποτελούνταν κυρίως από βιομηχανικές ενώσεις (π.χ. διαλύτες). Χουμικές ενώσεις δεν βρέθηκαν, γεγονός που δείχνει ότι δεν παράγονται οι ενώσεις αυτές στα στραγγίσματα από βιομηχανικά απόβλητα.

Με τη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους διαχωρίστηκαν οι οργανικές ενώσεις από δύο διαφορετικά στραγγίσματα ένα ακατέργαστο και το άλλο στραγγίσμα που είχε υποστεί κατεργασία σε λίμνη αερισμού. Βρέθηκε στο ακατέργαστο πολύ χαμηλή απορρόφηση στα 260 nm, δηλαδή χαμηλή συγκέντρωση σε κυκλικές ενώσεις και υψηλή συγκέντρωση σε λιπαρά οξέα, ενώ το κατεργασμένο περιείχε υψηλού MB ενώσεις, χαμηλό BOD_5 και χουμικά ή φουλβικά οξέα.





ΣΧΗΜΑ 1.7: Τυπικά χρωματογραφήματα και τα φάσματα απορρόφησης των χρωματογραφικών κλασμάτων (200-300 nm) ενός αστικού στραγγίσματος (α) και ενός βιομηχανικού επικίνδυνου στραγγίσματος (β)

1.4 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΠΟΥ ΕΦΑΡΜΟΣΤΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΕΙΔΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

1.4.1 Συμβολή της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους στην κλασμάτωση των αποβλήτων

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους (MB) των πρωτεϊνών. Τα τελευταία χρόνια επίσης, χρησιμοποιήθηκε και για τον προσδιορισμό του MB των περιεχόμενων χουμικών ενώσεων σε περιβαλλοντικά δείγματα, όπως είναι τα φυσικά νερά, τα απόνερα, τα χώματα, τα ιζήματα.

Οι χουμικές ενώσεις είναι κυρίαρχες ενώσεις στα φυσικά νερά. Για το λόγο αυτό, καλό είναι να αναφερθούν κάποιες πληροφορίες για τη δομή τους, για το πως επηρεάζουν ή επηρεάζονται από άλλες ενώσεις, για το πως ανιχνεύονται με τη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους και άλλες τεχνικές. Οι πληροφορίες αυτές μπορεί να φανούν χρήσιμες, γιατί μπορεί να βρεθούν κοινά στοιχεία με τα εξεταζόμενα δείγματα με τις τεχνικές που εφαρμόστηκαν.

Εκτός από τις χουμικές ενώσεις θα περιγραφούν για το πως διαχωρίζονται με την χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους τα πεπτίδια, αφού και αυτά θεωρούνται δομικές υπομονάδες των χουμικών ενώσεων και μπορεί επίσης να περιέχονται άμεσα στα απόβλητα.

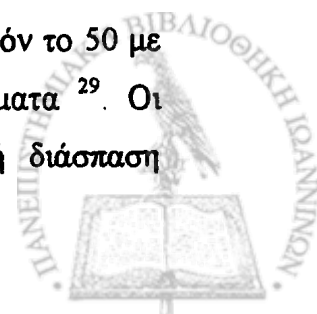
Επίσης, αναφέρονται και πληροφορίες για το διαχωρισμό των ταννινών και των υδατανθράκων με την χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους.

Στη διατριβή, έχουν επιλεγεί ως πρότυπες ενώσεις πεπτίδια για την τεχνική της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους.

1.4.1.1 Ενώσεις χουμικού τύπου

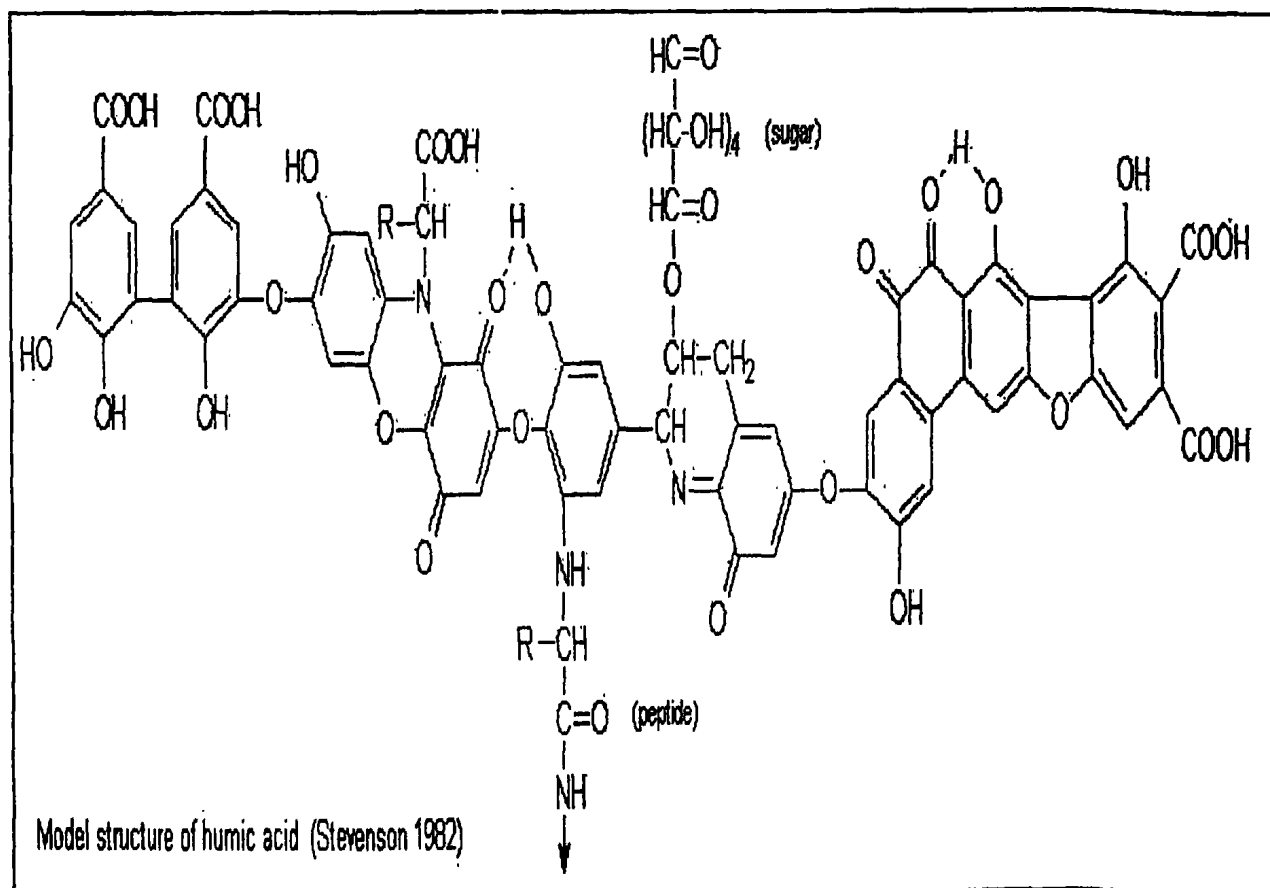
A. Περιγραφή

Οι χουμικές ενώσεις είναι κυρίαρχες στο περιβάλλον και αποτελούν σχεδόν το 50 με 80% του οργανικού υλικού στα χώματα και στα υδάτινα οικοσυστήματα ²⁹. Οι ενώσεις αυτές προέρχονται από τη φυσική, χημική και μικροβιακή διάσπαση



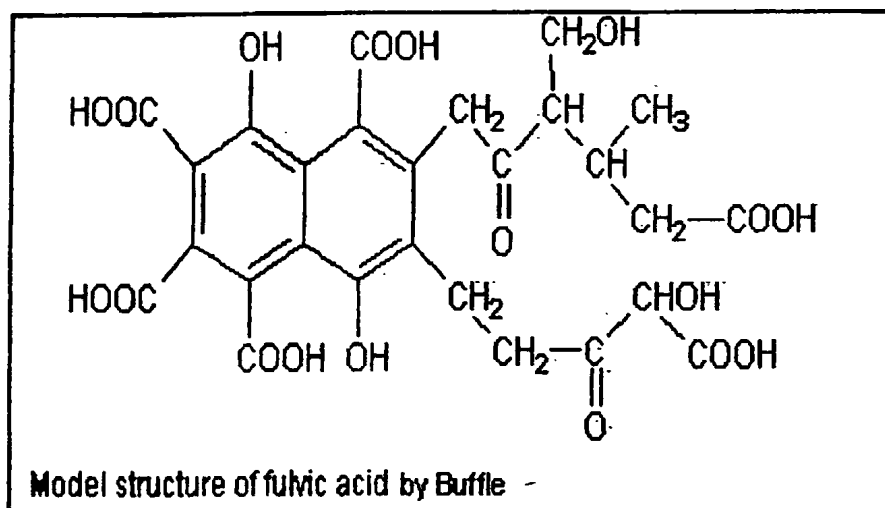
πολυμερικών οργανικών ενώσεων, όπως π.χ. η λιγνίνη. Τα 'χουμικά' νερά έχουν χρώμα κίτρινο-καφέ και υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του χρώματος και του χουμικού περιεχόμενου. Οι υδατικές χουμικές ενώσεις δεν ανήκουν σε κάποιο συγκεκριμένο τύπο ενώσεων, αν και ενώσεις που έχουν απομονωθεί, βρέθηκε ότι παίζουν βασικό ρόλο στην φύση³⁰⁻³³.

Το σύστημα των χουμικών ενώσεων δημιουργείται από τη σύνδεση διαφόρων συστατικών, όπως είναι τα αμινοξέα, οι λιγνίνες, οι πηκτίνες ή υδατάνθρακες μέσω ενδομοριακών δυνάμεων (δότη-δέκτη, ιοντικών, υδρόφιλων και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων). Δεν υπάρχει καθορισμένη δομή για τα χουμικά οξέα. Παραδείγματα δομής χουμικού οξέος και φουλβικού οξέος δίνονται στα σχήματα 1.8 και 1.9.



ΣΧΗΜΑ 1.8: Μοντέλο δομής χουμικού οξέος





ΣΧΗΜΑ 1.9: Μοντέλο δομής φουλβικού οξέος

Γενικά, οι περισσότερες μετρήσεις έχουν δείξει ότι τα χουμικά οξέα³⁴ έχουν MB που κυμαίνεται μεταξύ 2000-20000 και τα φουλβικά οξέα^{35,36} μεταξύ 1000-5000.

Οι χουμικές ενώσεις επίσης, έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν τη συμπεριφορά των υδρόφοβων οργανικών ενώσεων, αφού έχειδειχθεί ότι σχηματίζουν δεσμούς με αυτές καθώς και με βαρέα μέταλλα³⁷, με ενώσεις όπως το DDT³⁸, με τη χοληστερόλη³⁹, με τους διακυκλοφθαλικούς εστέρες⁴⁰.

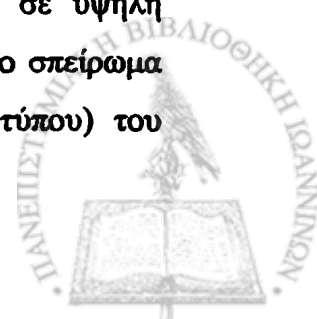
Οι χουμικές ενώσεις βρίσκουν διάφορες εφαρμογές στη γεωργία και στη βιομηχανία⁴¹. Στη γεωργία, ενώσεις όπως το χουμικό νάτριο και το χουμικό αμμώνιο, χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα στα λιπάσματα για την αύξηση της γονιμότητας των εδαφών.

Στη βιομηχανία χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα στο τσιμέντο, για την προετοιμασία του δέρματος, στην παραγωγή πλαστικών ως χρωστική του Nylon 6 ή του PVC.

B. Παράγοντες που επηρεάζουν τη συμπεριφορά των χουμικών ενώσεων

Έχει βρεθεί ότι όσο αυξάνει το pH και η συγκέντρωση σε μέταλλα αυξάνει το MB του πολυμερούς^{42,43}. Το πολυμερές μπορεί να συσπειρώνεται, όσο το pH μειώνεται ή όσο η ιοντική ισχύς αυξάνεται⁴⁴.

Τα χουμικά οξέα συμπεριφέρονται σαν σκληρά σφαιρικά κολλοειδή σε υψηλή οξύτητα και μοιάζουν με γραμμικά κολλοειδή σε χαμηλή οξύτητα⁴². Στο σπείρωμα (coiling) κλείνονται οι υδρόφοβες υπομονάδες (κυρίως αρωματικού τύπου) του πολυμερούς μέσα στο μεγαλομοριακό σκελετό από τις υδρόφιλες ομάδες.



Το φορτίο του πολυμερούς μειώνεται όσο μειώνεται το pH ή όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των μετάλλων^{34,45}. Η αλλαγή δείχνει ότι το πολυμερές γίνεται λιγότερο υδρόφιλο όσο το φορτίο μειώνεται. Η ιοντική ισχύς, όταν είναι αυξημένη, οδηγεί στην εξαλάτωση (salting out) των υδρόφοβων οργανικών ενώσεων. Έτσι, το χημικό δυναμικό μιας μη ιοντικής ένωσης στο νερό αυξάνεται με την αύξηση της ιοντικής ισχύος.

Γ. Μέθοδοι ανίχνευσης των χουμικών ενώσεων

Για την εκτίμηση του περιεχόμενου σε χουμικές ενώσεις των φυσικών νερών χρησιμοποιήθηκαν κυρίως φασματοφωτομετρικές και φθορισμομετρικές μέθοδοι:

1) Φασματοφωτομετρικές και φθορισμομετρικές μέθοδοι: Βρέθηκε⁴⁶ ότι τα μήκη κύματος 400 και 465 nm είναι τα πιο αξιόπιστα για τη μέτρηση του χρώματος σε σύγκριση με τα 250 nm. Το μέγιστο απορρόφησης σε όλα τα δείγματα μετατοπίζονταν κατά 6-12 nm σε μικρότερα μήκη κύματος, όσο αραιώνονταν τα δείγματα αυτά. Το χρώμα προέρχεται κυρίως από τις ενώσεις τύπου χουμικού οξέος, ενώ οι ενώσεις τύπου φουλβικού οξέος είναι υπαίτιες κυρίως για το φθορισμό των ενώσεων. Στην εργασία βρέθηκε, ακόμη, ότι οι δείκτες sUVa ($=A_{254nm}/mg\ CL^{-1}$) (όπου CL=εκπομπή χημειοφωταύγειας) δηλώνουν τον υψηλό βαθμό αρωματικότητας, ενώ η χαμηλή τιμή SAR ($=A_{254nm}/A_{400nm}$) αναμένεται σε υλικό με υψηλό MB. Δεν δηλώνουν όμως το βαθμό των συμπυκνωμένων αρωματικών δακτυλίων⁴⁷.

2) Με φασματοφωτομετρικές μεθόδους σε άλλα μήκη κύματος: Άλλα μήκη κύματος που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό του διαλυτού οργανικού υλικού είναι τα 272 και 280 nm, (συσχετίζουν την αρωματικότητα και το MB^{22,48}), ο λόγος 250 nm/365 nm (συσχετίζει πάλι την αρωματικότητα και το MB⁴⁹), καθώς και στο ορατό, ο λόγος 465 nm/665 nm²¹.

Το σχετικό ποσό αρωματικών ενώσεων στις χουμικές ενώσεις αυξάνονταν με την αύξηση του MB και έτσι αναμένονταν ότι υπάρχει συσχέτιση της αρωματικότητας με το χρώμα. Βρέθηκε⁴⁹ ότι το περιεχόμενο σε υδροξυλομάδες των φαινολικών ενώσεων και η αναλογία N/C συσχετίζονται περισσότερο με το χρώμα από ότι οι αναλογίες H/C και O/C.

3) Μία άλλη μέθοδος μας δίνει πληροφορίες για τη δομή των NOM μορίων, από την εκτίμηση του σχήματος, της έντασης και της θέσης των UV απορροφήσεων ειδικού τύπου χρωμοφόρων ομάδων²⁵. Η μέθοδος βασίζεται στις τρεις ταινίες απορρόφησης του UV φάσματος των φυσικών νερών, που ονομάζονται LE (Local-excitation, 180

nm), Bz (benzenoid, 203 nm) και ET (Electron-transfer, 253 nm) του βενζολίου. Ειδικότερα, οι δύο τελευταίες από τις παραμέτρους, οι Bz και ET, βρέθηκε ότι είναι ευαίσθητες στη σύσταση του NOM και στη μετατροπή που προκαλείται στο NOM κατά τη χλωρίωση και συσσωμάτωση.

Δ. Κλασμάτωση των χουμικών ενώσεων με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους

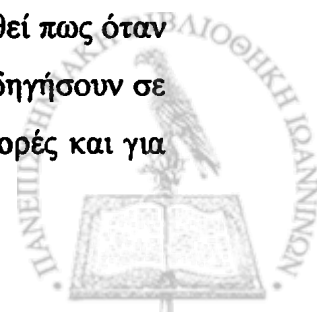
1) Σε μία εργασία ⁵⁰ που χρησιμοποιήθηκε η SEC και ανιχνευτές UV και οργανικού άνθρακα για την κλασμάτωση του περιεχόμενου σε νερά NOM βρέθηκαν τέσσερις ομάδες: πολυσακχαρίτες, χουμικές ενώσεις, χαμηλού MB καρβοξυλικά οξέα και χαμηλού MB ενώσεις.

2) Σε άλλη εργασία ⁵¹ έγινε διάκριση και ταξινόμηση χουμικών ενώσεων διαφορετικής προέλευσης με SEC χρησιμοποιώντας κάποιους υπολογισμούς. Οι ερευνητές βασίστηκαν στον υπολογισμό από τα αρχικά δεδομένα της SEC των αρχικών, κεντρικών και κανονικοποιημένων στατιστικών παραγώγων (moments) και κάποιων από τους λόγους των. Υπολογίστηκε το μέσο βάρος MB και ο λόγος φορτίο (z)/βάρος των συντελεστών κατανομής, K_d των χουμικών ενώσεων. Βρέθηκε ότι είναι οι καλύτεροι δείκτες, καθώς δίνουν περισσότερες πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά του MB (μέσα MB: M_w , M_z , M_n και οι λόγοι των) των χουμικών ενώσεων.

3) Έχει βρεθεί ²² με HP-SEC (στήλη Protein-Pak 125 modified silica) ότι ο όξινος χαρακτήρας και η πολυηλεκτρολυτική φύση των χουμικών ενώσεων μοιάζει περισσότερο με τα άλατα νατρίου του σουλφονικού πολυστυρόλιου (PSS) παρά με τις πολυδεξτράνες (PDX) και τις πολυαιθυλενογλυκόλες (PEG). Στην ίδια εργασία βρέθηκε ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της A_{280nm} , της ολικής αρωματικότητας και του στατιστικού βάρους του MB των χουμικών ενώσεων.

4) Άλλοι ερευνητές ⁵² βρήκαν ότι με τη χρήση της τεχνικής HP-SEC μπορεί να μετρηθεί αξιόπιστα το MB των χουμικών και φουλβικών οξέων με την προσθήκη ενός ανόργανου ηλεκτρολύτη (π.χ. KCl, NaCl) στην κινητή φάση και χρησιμοποιώντας για τη βαθμονόμηση της στήλης ενώσεις μη πρωτεϊνικού τύπου τυχαίας ελίκωσης.

Στην ίδια εργασία καθώς επίσης και σε άλλες δύο εργασίες ^{53,54} έχει δειχθεί πως όταν χρησιμοποιηθούν για τη βαθμονόμηση σφαιρικές πρωτεΐνες, μπορεί να οδηγήσουν σε υπερεκτίμηση του MB των χουμικών ενώσεων κατά 3 ή περισσότερες φορές και για



το λόγο αυτό προτείνουν τη χρήση των αλάτων νατρίου του σουλφονικού πολυστυρόλιου (PSS) για πρότυπες ενώσεις γιατί έχουν μορφή τυχαίας ελίκωσης.

5) Αναπτύχθηκε επίσης ένα άλλο μοντέλο πρόβλεψης για τον υπολογισμό του MB των HS (χουμικών ενώσεων) ⁵⁵ χρησιμοποιώντας μία ευρεία κλίμακα ενώσεων χαμηλού MB που θεωρήθηκαν ως υπομονάδες των χουμικών ενώσεων. Βρέθηκε ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της συμπεριφοράς έκλυσης μίας ένωσης με τις δομικές παραμέτρους της ένωσης. Ως δομικές παράμετροι χρησιμοποιήθηκαν οι ατομικοί λόγοι και οι λόγοι κατανομής του C ή του O μεταξύ των λειτουργικών ομάδων.

1.4.1.2 Πεπτίδια

A. Περιγραφή και ιδιότητες

Τα πεπτίδια όπως και οι πρωτείνες σχηματίζονται από αμινοξέα (A.O) ενωμένα με πεπτιδικό δεσμό. Ο αριθμός των αμινοξέων που ενώνονται ποικίλει από λίγες έως πολλές εκατοντάδες, με MB που κυμαίνονται από λίγες έως πολλές εκατοντάδες χιλιάδες Daltons. Αν και δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος ο διαχωρισμός μεταξύ πεπτιδίου και πρωτεΐνης, είναι αποδεκτό ότι λιγότερο από 50 αμινοξέα αποτελούν ένα πεπτίδιο. Ο όρος πολυπεπτίδιο μπορεί να θεωρηθεί ταυτόσημος και με μία πρωτεΐνη και με ένα πεπτίδιο. Μικρές πρωτείνες όπως η ubiquitin (MB 8565), με 76 αμινοξέα μπορεί να έχουν σταθερή τρισδιάστατη δομή που προσδιορίζεται με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X ⁵⁶ ή σε διάλυμα με τεχνική NMR ^{57,58}.

Τα πολύ μικρά πεπτίδια με μικρό αριθμό αμινοξέων δεν υιοθετούν σταθερές δομές σε διάλυμα, αλλά υπάρχουν σε πολλές διαμορφώσεις. Κρυσταλλικές μορφές της Leu-enkephalin που περιέχει 5 A.O. έχουν δείξει διαφορετικές διαμορφώσεις ⁵⁹. Πάντως, αν και σχετικά μικρά πεπτίδια αποτελούμενα πιθανόν από 11 αμινοξέα μπορεί να δείχνουν σταθερές δευτεροταγείς διαμορφώσεις. Για παράδειγμα, το πεπτίδιο Αβ (25-35) με 11 αμινοξέα, κλάσμα του Αλτσχάμερ β-amyloid πεπτιδίου μπορεί να παρουσιάσει μία μετατροπή της τυχαίας ελίκωσης σε β-πτυχωτή επιφάνεια ⁶⁰. Γενικά πάντως, όσο το μέγεθος των πεπτιδίων αυξάνεται σε 25 αμινοξέα, τόσο η διαμόρφωση σε σταθερές τρισδιάστατες δομές αρχίζει και αυξάνεται ⁶¹.



B. Μέθοδοι ανίχνευσης των πεπτιδίων

Τα πεπτίδια απορροφούν στο UV με μέγιστο γύρω στα 187 nm αλλά λόγω των παρεμποδίσεων από τα συστατικά του ρυθμιστικού, σπάνια χρησιμοποιούνται μήκη κύματος κάτω από 200 nm. Στην πράξη αυτά τα μήκη κύματος που χρησιμοποιούνται είναι τα 210, 214 και 220 nm. Χρωματογραφήματα που δείχνουν τον διαχωρισμό ενός ιδανικού μίγματος πεπτιδίων αλλά με ανίχνευση στα 200, 210, 220 και 230 nm εμφανίζουν μείωση της ευαισθησίας καθώς αυξάνει το μήκος κύματος. Μία μείωση⁶² κατά 4 φορές της ευαισθησίας σημειώνεται με αύξηση του μήκους κύματος κατά 10 nm.

Σε κινητές φάσεις που απορροφούν ισχυρά στο UV όπως είναι τα διαλύματα του δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου (SDS), είναι αδύνατη η παρακολούθηση της απορρόφησης στην πιο ευαίσθητη περιοχή για τα πεπτίδια, και για το λόγο αυτό πρέπει να χρησιμοποιηθεί το μήκος κύματος 280 nm. Στο μήκος κύματος αυτό απορροφούν μόνο πεπτίδια που περιέχουν τυροσίνη, φαινυλαλανίνη ή θρυπτοφάνη⁶³. Τα ρυθμιστικά που περιέχουν SDS χρησιμοποιούνται για να αποδιατάξουν τα πεπτίδια, ώστε να έχουν όλα δομή τυχαίας ελίκωσης. Εκτός από το SDS, άλλες ενώσεις που αποδιατάσσουν (μετουσιώνουν) είναι η ουρία⁶⁴, το υδροχλωρικό άλας της γουανιδίνης⁶⁵.

Με ανιχνευτή πολλαπλών φωτοδιόδων (DAD) μπορούν να ανιχνευτούν πεπτίδια που περιέχουν τυροσίνη ή θρυπτοφάνη, ενώ με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή τα πεπτίδια που περιέχουν τυροσίνη, θρυπτοφάνη, μεθειονίνη, κυστεΐνη ή κυστίνη⁶⁶.

Γ. Παράγοντες που επηρεάζουν την δομή των πεπτιδίων

Έχει δειχθεί⁶⁷ ότι με τη μεταβολή του pH ένα πεπτίδιο μετατρέπεται από τυχαίας ελίκωσης μονομερές σε α-έλικα δύο σπειραμάτων διμερές.

Σε άλλη εργασία⁶⁸ παρατηρήθηκε η συσπείρωση ενός πεπτιδίου 20-μονάδων της λυσοζύμης (41-60), προς διαμόρφωση που αντιστοιχεί σε περιοχή τριπλής β-πτυχωτής επιφάνειας στην φυσική πρωτεΐνη, όταν μειώνεται το pH από 6,8 σε 2,5. Η συσπείρωση σε τριμερή και μεγαλύτερα ολιγομερή συνοδεύεται με αλλαγή στη δομή από τυχαία έλικα σε β-πτυχωτή επιφάνεια



Δ. Μη ιδανική SEC (Non-Ideal SEC)

Η ιδανική χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) διαχωρίζει τις ενώσεις βάσει του μεγέθους των. Αυτό πετυχαίνεται μόνο όταν η στατική φάση είναι αφόρτιστη και έχει παρόμοια πολικότητα με την κινητή φάση. Στην πράξη όμως δεν ισχύουν οι προϋποθέσεις αυτές. Αν το υλικό της στατικής φάσης είναι πιο υδρόφοβο από την κινητή φάση, τότε συμβαίνουν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις των ενώσεων μεταξύ τους, καθυστερώντας έτσι την έκλουση. Αν το υπόστρωμα φέρει φορτίο, τότε θα συμβεί ιονανταλλαγή με τα αντίθετα φορτισμένα μόρια καθυστερώντας πάλι την έκλουση. Σε σπάνιες περιπτώσεις, τα μόρια μπορεί να εκλουσθούν μετά τον V_i . Τα μόρια που φέρουν ίδιο φορτίο με αυτό της στατικής φάσης θα υποστούν ηλεκτροστατική απόθεση, γνωστή ως 'ion exclusion' και θα εκλουσθούν νωρίτερα από ότι αναμένεται, στην καλύτερη περίπτωση σε όγκο V_i ⁶⁹. Οι πρωτεΐνες που είναι θετικά φορτισμένες υπόκεινται σε ιονανταλλαγή και κατακρατούνται στην στήλη. Αντίθετα, οι αρνητικά φορτισμένες υπόκεινται σε αποκλεισμό ιόντος και εκλούνται πολύ νωρίτερα από ότι αναμένονται^{69,70}.

Όταν η SEC εκτελείται σε χαμηλό pH γίνεται ακριβώς το ανάποδο, οι κατιοντικές πρωτεΐνες αποκλείονται γρήγορα και οι ανιοντικές κατακρατώνται⁷¹. Όταν λέμε κατιοντικές πρωτεΐνες εννοούμε αυτές που έχουν βασικά αμινοξέα όπως αργινίνη, λυσίνη, ιστιδίνη ενώ ανιοντικές αυτές που περιέχουν όξινα αμινοξέα όπως το ασπαραγινικό οξύ, το γλουταμινικό οξύ.

Όταν χρησιμοποιούνται διαφορετικές κινητές φάσεις στη χρωματογραφία αποκλεισμού ιόντος, η αλλαγή του όγκου έκλουσης ενός συστατικού δεν δηλώνει πάντα αλλαγή στο μέγεθός του. Τότε έχουμε τη μη ιδανική χρωματογραφία αποκλεισμού. Έχειδειχθεί ότι, αν ο χαρακτήρας διαμόρφωσης ενός μίγματος πεπτιδίου-πρωτεΐνης σε μία κινητή φάση είναι αβέβαιος και απαιτείται ιδανική συμπεριφορά έκλουσης, η SEC πρέπει να γίνεται οπωσδήποτε, υπό συνθήκες μετουσίωσης, με αντιδραστήρια όπως είναι π.χ. η ουρία.

1.4.1.3 Εφαρμογές της SEC σε διαχωρισμούς άλλων μεγαλομορίων

Κάποιες άλλες εφαρμογές της SEC αξίζει να αναφερθούν για τον διαχωρισμό άλλων μεγαλομορίων ή βιοπολυμερών. Δεν αναφέρονται όμως σε δείγματα νερών ή αποβλήτων.



Υδατάνθρακες-Πολυσακχαρίτες και κυτταρινώδη υλικά

Η μέθοδος SEC, με ανιχνευτή διαφορικής διαθλασιμετρίας, χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και ανίχνευση των υδατανθράκων. Με την τεχνική αυτή έγιναν διάφορες μελέτες.

Ερευνήθηκε ⁷² η διαλυτότητα δειγμάτων αμύλου με διαφορετικές αναλογίες αμυλόζης / αμυλοπηκτίνης σε διαλύματα NaOH και DMSO. Η κινητή φάση ήταν διάλυμα 0,001 N KOH.

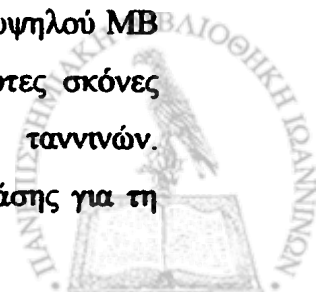
Με τη SEC αλλά και με άλλες μεθόδους ανίχνευσης χαρακτηρίστηκαν η υδροξυαιθυλοκυτταρίνη, η καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη καθώς και εστέρες κυτταρίνης ⁷³. Επίσης μελετήθηκαν η υδροξυπροπυλο-μεθυλο-κυτταρίνη και η πολυπροπυλενογλυκόλη σε οφθαλμικά διαλύματα ⁷⁴.

Λιγνίνες και Ταννίνες

- Τεταρτοταγή αμινοσύμπλοκα της λιγνίνης αναλύθηκαν ⁷⁵ με τη μέθοδο SEC με σχηματισμό ζεύγους ιόντων. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν διάλυμα 20 mM τεταρτοταγούς αμίνης σε τετραυδροφουράνιο (THF) και η στήλη ήταν πληρωμένη με συμπολυμερές στυρόλιου-διβινυλοβενζόλιου. Με την προσέγγιση αυτή, αποφεύχθηκαν η ενδομοριακή αλληλεπίδραση και η προσρόφηση στο υλικό της στήλης χωρίς να χρειαστεί να γίνει παραγωγοποίηση του δείγματος. Έχει χρησιμοποιηθεί η SEC για τη λιγνίνη από χαρτοπολτό ⁷⁶. Επίσης, μελετήθηκε ⁷⁷ η κατανομή μοριακών βαρών των ταννινών που προέρχεται από ξύλο, φλοιό δέντρου και φύλλα

Σε δείγματα που περιέχουν υδατάνθρακες και λιγνίνες, όπως είναι το ξύλο και ο χαρτοπολτός εφαρμόστηκε η SEC χρησιμοποιώντας αλκαλικά εκλουστικά μέσα ⁷⁸. Χρησιμοποιήθηκαν ο αμπερομετρικός και UV ανιχνευτής για τις δύο κατηγορίες των ενώσεων αντίστοιχα. Οι αλληλεπιδράσεις των αρωματικών μορίων και της στήλης έδειξαν ότι εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του αλκαλικού περιβάλλοντος στο εκλουστικό. Δε φάνηκε να υπάρχουν προσροφητικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ υδατανθράκων και λιγνινών κατά τη SEC.

Μελετήθηκε ⁷⁹ η σύμπλεξη των ταννικών οξέων με διαλυτές και αδιάλυτες πρωτεΐνες και φάνηκε ότι οι διαλυτές πρωτεΐνες επιλέγουν να συμπλέκονται με τις υψηλού MB ενώσεις ταννινών όπως είναι οι πολυγαλλολο-γλυκόλες, ενώ οι αδιάλυτες σκόνες επιλέγουν να συμπλεχθούν με τις χαμηλότερου MB ενώσεις ταννινών. Χρησιμοποιήθηκε η υγρή χρωματογραφία κανονικής και ανάστροφης φάσης για τη



μελέτη των ταννινών, ενώ για τις πρωτεΐνες η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους.

Νουκλεϊκά οξέα

Σε σύγκριση με τις πρωτεΐνες υπάρχει πολύ περιορισμένη εφαρμογή της μεθόδου SEC στους διαχωρισμούς των νουκλεϊκών οξέων. Μελετήθηκε ⁸⁰ η προστατευτική επίδραση της πρωτεΐνης BSA σε διάφορα διαλύματα άλατος και ρυθμιστικού στην καταστροφή του DNA που γινόταν από την ακτινοβολήση ιόντων. Το DNA των πλασμιδίων απομονώθηκε με την SEC με διάφορα υλικά πακεταρίσματος της στήλης, συμπεριλαμβανόμενου του Superose και του Sephacryl ⁸¹.

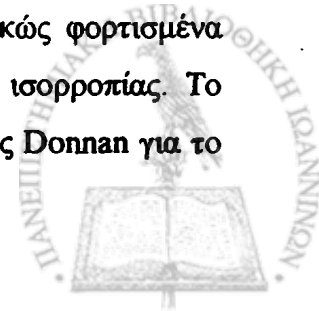
1.4.2 Συμβολή της τεχνικής της διαπίδυσης στην κλασμάτωση των αποβλήτων

1.4.2.1 Εφαρμογές της διαπίδυσης σε περιβαλλοντικά δείγματα

Η τεχνική της διαπίδυσης έχει περιορισμένη εφαρμογή στο χαρακτηρισμό του διαλυμένου οργανικού υλικού (DOC) σε περιβαλλοντικά δείγματα, αφού προτιμώνται η υπερδιήθηση και η ανάστροφη ώσμωση. Η διαπίδυση έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για το διαχωρισμό των μορφών διαφόρων μετάλλων ⁸², φωσφορικών ⁸³ και για μικροβιολογικές μελέτες ⁸⁴ σε περιβαλλοντικά δείγματα.

Μία εφαρμογή της διαπίδυσης που έγινε σε φυσικά νερά ³⁸ έδειξε ότι σημαντική ποσότητα του DDT (2,2-δις-(4-χλωροφαινυλο)-1,1,1-τριχλωροαιθάνιο) μπορεί να δεσμευθεί με χουμικές ενώσεις.

Ένα από τα μειονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι ότι απαιτείται μεγάλος χρόνος για να επιτευχθεί η ισορροπία. Ο χρόνος κυμαίνεται από 1-4 εβδομάδες για την επί τόπου (in situ) διαπίδυση νερού από ποτάμι ⁸⁵, αλλά μέχρι και 24 ώρες ^{86,87} είναι το συνηθέστερο. Το πρόβλημα αυτό, οφείλεται στο γεγονός ότι οι μεμβράνες έχουν συνήθως αρνητικό φορτίο και έτσι τα κατιόντα, τα ανιόντα και τα αφόρτιστα μόρια διαπιδύονται με διαφορετικό ρυθμό από την μεμβράνη. Τα αρνητικώς φορτισμένα μόρια είναι αυτά που καθορίζουν το χρόνο για την επίτευξη της ισορροπίας. Το φαινόμενο αυτό χρησιμοποιείται με επιτυχία στις τεχνικές διαπίδυσης Donnan για το



διαχωρισμό φορτισμένων ενώσεων με μεμβράνες αδιαπέραστες σε ανιονικά σύμπλοκα ⁸⁸.

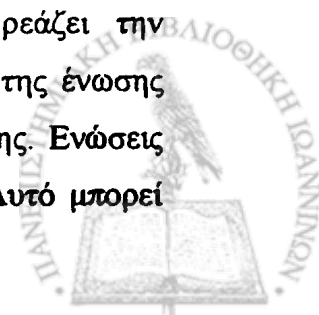
Ένα άλλο μειονέκτημα της διαπίδυσης είναι η μόλυνση ⁸⁹ των μεμβρανών, αλλά έχει δειχθεί ότι οι μεμβράνες μπορούν να καθαριστούν με ανόργανα οξέα ^{86,87}.

Επίσης, οι ενώσεις μπορεί να σχηματίσουν δεσμούς με το υλικό της μεμβράνης. Έχουν βρεθεί αλληλεπιδράσεις δύο ειδών: ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες.

Σε μία μελέτη ⁹⁰ με τα φάρμακα βενζοδιαζεπίνες παρατηρήθηκε ότι η ανάκτηση του oxazepam, που είναι αφορτιστο σε pH 4 έως 7, βρέθηκε ανεξάρτητη από το pH του δείγματος, ενώ το nitrazepam που είναι μερικώς θετικά φορτισμένο μόριο, σε pH μικρότερο του 5, παρουσίασε μικρότερη ανάκτηση σε pH 4 από ότι σε pH 7. Από αυτό συνάγεται ότι η παρουσία αρνητικών φορτίων στη μεμβράνη ευθύνεται για τη δημιουργία δεσμού μεταξύ της μεμβράνης και των θετικά φορτισμένων ενώσεων και συνεπώς οδηγεί στη χαμηλή ανάκτησή τους. Από την άλλη πλευρά, η παρουσία αρνητικών φορτίων στο μόριο βρέθηκε ότι δεν αλλάζει την ανάκτηση των ενώσεων αυτών ⁹¹.

Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις έχει βρεθεί ότι συμβαίνουν μεταξύ των ενώσεων και των μεμβρανών κυτταρίνης. Σε μελέτη ⁹⁰ που έγινε με τις βενζοδιαζεπίνες, nitrazepam και oxazepam που έχουν παρόμοιες υδροφοβικότητες η ανάκτησή τους βρέθηκε περίπου 80%, ενώ της περισσότερο υδρόφοβης ένωσης diazepam βρέθηκε 60%. Η φύση των αλληλεπιδράσεων αυτών δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Πιθανή αιτία μπορεί να είναι ο σχηματισμός συμπλόκων των αρωματικών ενώσεων που παρεισφύουν στις πολυμερικές αλυσίδες της κυτταρίνης, επειδή η αναγεννημένη κυτταρίνη, έχει ένα παραμορφωμένο πολυμερικό δίκτυο και δείχνει πολύ λιγότερη δέσμευση από την φυσική κυτταρίνη, η οποία έχει πολύ τακτική πολυμερική σύσταση ⁹². Οι αλληλεπιδράσεις αυτές έχει δειχθεί ^{93,94} ότι μειώνονται με την προσθήκη μιάς υδρόφοβης κατιοντικής τασιενεργής ενώσεως στο δείγμα που η δράση του θα είναι πιθανώς να καλύψει τις θέσεις αλληλεπίδρασης πάνω στη μεμβράνη. Πρέπει όμως να ελεγχθεί η συγκέντρωση της τασιενεργούς αυτής ένωσης, γιατί αν υπερβεί την κρίσιμη τιμή μειώνεται η δράση της.

Ένα άλλο πρόβλημα στη διαπίδυση είναι ο σχηματισμός δεσμού των ενώσεων με μεγαλομοριακές ενώσεις, όπως είναι οι πρωτεΐνες, το οποίο επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Αυτό συμβαίνει επειδή το ποσοστό της ένωσης που δεν δεσμεύεται με την πρωτεΐνη διαχέεται δια μέσου της μεμβράνης. Ενώσεις που δεσμεύονται με τις πρωτεΐνες έχουν χαμηλά ποσοστά ανάκτησης. Αυτό μπορεί



να διορθωθεί αν οι ενώσεις αυτές απελευθερωθούν από τις θέσεις που σχηματίζουν δεσμούς με τις πρωτεΐνες. Ένας τρόπος είναι να αλλάξει η δομή της πρωτεΐνης με μεταβολή του pH⁹⁵, αλλά υπάρχει κίνδυνος έτσι να καταβυθιστεί η πρωτεΐνη. Άλλος τρόπος είναι να προστεθεί οργανικός διαλύτης (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο) αλλά υπάρχει κίνδυνος να καταστραφεί η μεμβράνη. Επίσης, με την προσθήκη ενώσεων που ονομάζονται αντικαταστάτες που ανταγωνίζονται με τις ενώσεις του δείγματος για τους δεσμούς με τις πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, η ανθρώπινη αλβουμίνη ορού, έχει δύο θέσεις για δεσμούς με τα φάρμακα, την θέση warwarin και τη θέση diazepam. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να απελευθερωθούν με προσθήκη λιπαρών ενώσεων μεγάλης αλυσίδας ατόμων άνθρακα⁹⁰.

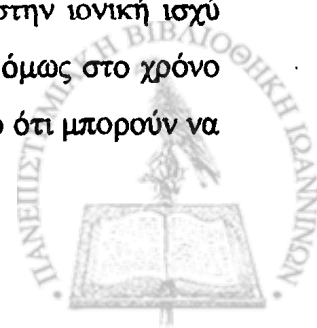
Πολλές εργασίες τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει για την on-line διαπίδυση για την προετοιμασία του δείγματος και μετέπειτα χρωματογραφικό διαχωρισμό των ενώσεων. Οι εργασίες αυτές έχουν εφαρμοστεί κυρίως σε βιοχημικές αναλύσεις και σε αναλύσεις τροφίμων. Οι βιοχημικές αναλύσεις αφορούν τον προσδιορισμό φαρμάκων και ενδογενών ενώσεων στον ορό του αίματος⁹⁶. Στις αναλύσεις τροφίμων η on-line διαπίδυση έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό φυσικών συστατικών όπως πρωτεΐνες, λιπίδια⁹⁷ ή υπολειμμάτων φαρμάκων⁹⁸.

Από τα παραπάνω διαφαίνεται ότι είναι ιδιαίτερα δύσκολος ο διαχωρισμός των ενώσεων με την μέθοδο της διαπίδυσης και πολύ περισσότερο όταν μιλάμε για τα υγρά απόβλητα.

1.4.2.2 Χαρακτηρισμός του οργανικού υλικού με τις τεχνικές υπερδιήθησης και ανάστροφης ώσμωσης

Η υπερδιήθηση είναι μία ήπια διαδικασία αφού αποφεύγει τις ακραίες τιμές pH και τα χημικά πρόσθετα. Έτσι, δεν παρατηρούνται αλλαγές στο pH. Με τις μεμβράνες υπερδιήθησης μεγάλο ρόλο παίζει το σχήμα περισσότερο παρά το μέγεθος των μεγαλομορίων, καθώς αυτά μπορεί να πάρουν διαφορετικές διαμορφώσεις ή μεγέθη στο νερό ανάλογα με τις συνθήκες pH και ιοντικής ισχύος που επικρατούν^{42,99,100}.

Η μέθοδος της ανάστροφης ώσμωσης έχει το μειονέκτημα ότι συμπυκνώνονται και οι ανόργανες ενώσεις μαζί με τις οργανικές με αποτέλεσμα η αλλαγή στην ιοντική ισχύ να κινδυνεύει να μεταβάλλει τη χημική φύση του DOC. Πλεονεκτεί όμως στο χρόνο που απαιτείται για την προετοιμασία ο οποίος είναι ελάχιστος και στο ότι μπορούν να απομονωθούν μεγάλες ποσότητες DOC από μεγάλους όγκους νερού.



Με συνδυασμό των δύο αυτών τεχνικών ¹⁰¹ ανακτήθηκε το 90% του DOC και χωρίστηκε ανάλογα με το μέγεθός τους σε τρία κλάσματα: υψηλού, μεσαίου και χαμηλού MB κλάσματα. Διαπίδυση-διήθηση χρησιμοποιήθηκε για να διαχωριστεί το DOC, οπότε τα μεσαίου και υψηλού MB κλάσματα αφαιρέθηκαν, ενώ οι ανόργανες ενώσεις παρέμειναν στο χαμηλού MB κλάσμα.

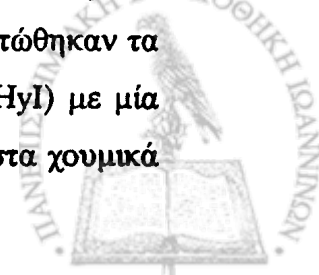
Αποκλειστικά με την τεχνική της υπερδιήθησης, έχουν αναπτυχθεί μοντέλα για τη βελτίωση των μετρήσεων κατανομής μεγέθους χρησιμοποιώντας είτε μεγάλο όγκο (2,5 L) δείγματος φυσικού νερού ¹⁰² είτε μικρό (200 ml) όγκο ¹⁰³.

Με ένα φορητό σύστημα ανάστροφης ώσμωσης, απομονώθηκε ¹⁰⁴ το 90% περίπου του DOC από 150-200 L νερού (επιφανειακού ή υπόγειου) / ώρα χωρίς την προσθήκη χημικών αντιδραστηρίων. Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε κατιοντική ρητίνη για την απομάκρυνση των πολυκατιόντων και σχετικά μη πολική μεμβράνη από πολυαμίδιο.

- Ένα άλλο φορητό σύστημα ανάστροφης ώσμωσης χρησιμοποιήθηκε ¹⁰⁵ για την *in situ* συλλογή και συμπύκνωση από τέσσερα φυσικά νερά και ένα υγρό απόβλητο. Απομονώθηκαν με ρητίνη XAD-8 τα κλάσματα των χουμικών οξέων (HA), των φουλβικών οξέων (FA) και το υδρόφιλο κλάσμα (HyI) και ο καθαρισμός τους έγινε με τη μέθοδο της κατιονανταλλακτικής ρητίνης. Στα φυσικά νερά, βρέθηκε ότι κυριαρχούν τα φουλβικά οξέα σε ποσοστό 54-68%, ενώ το 13-29% και το 9-30% του DOC αποτελείται από χουμικά οξέα και το υδρόφιλο κλάσμα, αντίστοιχα. Στο υγρό απόβλητο δεν βρέθηκαν σχεδόν καθόλου χουμικά οξέα και το υδρόφιλο κλάσμα υπερτερούσε έναντι των φουλβικών οξέων. Το υδρόφιλο κλάσμα περιείχε κατά κύριο λόγο απλές ενώσεις και λιγότερο πολύπλοκα μίγματα από τα άλλα δύο κλάσματα. Οι αλειφατικές ομάδες ακολουθούν την σειρά HA<FA<HyI, ενώ οι αρωματικές την αντίθετη, όπως έδειξε η στοιχειακή ανάλυση.

Σε άλλη εργασία κλασματώθηκε το DOC σε νερά ¹⁰⁶ με την βοήθεια ενός φορητού συστήματος ανάστροφης ώσμωσης σε υδρόφοβα (HPO-) και υδρόφιλα (HPI)-οξέα (-A), βάσεις (-B), ουδέτερα (-N) και σε φαινολικά (-Ph), σύμφωνα με μία άλλη μέθοδο ^{107,108}. Τα υδρόφιλα οξέα που είναι και το κύριο συστατικό των φουλβικών οξέων, είναι μίγμα από πολύπλοκα αλειφατικά καρβοξυλικά οξέα, απλά αρωματικά οξέα και φαινόλες. Τα υδρόφιλα βασικά είναι υδρογονάνθρακες και καρβονυλικές ενώσεις ¹⁰⁹

Σε νερά ποταμών και υδάτινων ταμιευτήρων απομονώθηκαν και κλασματώθηκαν τα χουμικά οξέα (HA), τα φουλβικά οξέα (FA) και το υδρόφιλο κλάσμα (HyI) με μία ρητίνη XAD-8 και XAD-4 ¹¹⁰. Η αρωματικότητα βρέθηκε μεγαλύτερη στα χουμικά

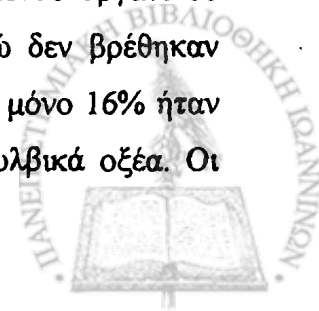


οξέα και χαμηλότερη στο υδρόφιλο κλάσμα των οξέων, ενώ το καρβοξυλικό περιεχόμενο και ο αλειφατικός χαρακτήρας βρέθηκαν πιο έντονα στα τελευταία. Το φαινολικό περιεχόμενο ήταν υψηλότερο στα χουμικά οξέα και λιγότερο στο υδρόφιλο κλάσμα. Το περιεχόμενο σε C μειώνεται με την σειρά HA>FA>XAD-4 και τα αμινοξέα και τα ουδέτερα σάκχαρα κατά την σειρά HA>XAD-4>FA. Από τα αμινοξέα βρέθηκαν κυρίως η γλυκίνη, μετά το ασπαραγινικό οξύ, γλουταμινικό οξύ (δηλ. τα ουδέτερα υδρόφιλα, μετά τα όξινα, μετά τα βασικά και τέλος τα περιέχοντα-θείο).

Σε απόβλητα, έχουν χρησιμοποιηθεί ¹¹¹ ημιπερατές μεμβράνες από πολυαιθυλένιο για την αυτόματη δειγματοληψία επιλεγμένων υδρόφοβων οργανικών ρυπαντών. Σε διάστημα 24 ωρών έως και 6 ημερών ανιχνεύθηκαν στη μεμβράνη πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, εννυλοφαινόλη και φθαλικοί εστέρες ενώ δεν ανιχνεύθηκαν στο νερό. Η συγκέντρωση των ενώσεων αυτών στη μεμβράνη βρέθηκε ότι είναι ανάλογη με τη συγκέντρωσή των στο νερό.

Από άλλη εργασία ¹¹² σε υπόγεια νερά που έχουν ρυπανθεί, βρέθηκε ότι ένα ποσοστό, περίπου 60% του διαλυμένου οργανικού υλικού, αποτελείται από φουλβικά οξέα με MB 1800 Da. Το 30% ήταν το υδρόφιλο κλάσμα με MB 2100 Da, ενώ το υπόλοιπο 10% αποτελούνταν από χουμικά οξέα με MB 2600 Da. Στα χουμικά οξέα, η αναλογία O/C ήταν σχετικά υψηλή, δηλώνοντας ότι υπάρχει υψηλό ποσοστό καρβοξυλικών και φαινολικών ομάδων (ασθενείς όξινες ομάδες) ή υδατανθράκων. Στο κλάσμα των φουλβικών και το όξινο κλάσμα τα καρβοξυλικά οξέα βρισκόταν στο μεγαλύτερο ποσοστό. Με FT-IR, στα φουλβικά έδειξαν να κυριαρχούν τα καρβοξυλικά οξέα, οι αλδευδικές και οι κετονικές ομάδες. Πάντως, ο διαχωρισμός είναι αρκετά δύσκολος επειδή και τα τρία κλάσματα έχουν παρόμοιες ιδιότητες, και ίσως να μην έχει και μεγάλη σημασία. Χρησιμοποιώντας την τεχνική της διαπίδυσης βρέθηκε ότι μετά την πάροδο δύο ημερών οι συγκεντρώσεις από τις ανόργανες ενώσεις παρέμειναν πολύ υψηλές και ότι η απώλεια από το υδρόφιλο κλάσμα ήταν περίπου 35%, που αντιστοιχεί στο 10% του συνολικού περιεχομένου. Η μέθοδος απορρίφθηκε, ενώ τα χουμικά και φουλβικά οξέα απομονώθηκαν με μεμβράνη διαπίδυσης με όριο αποκλεισμού μεγέθους (MWCO) 12000-14000.

Σε απόνερα και υπόγεια νερά ποσοστό πάνω από 50% του διαλυμένου οργανικού υλικού βρέθηκε ¹¹³ ότι αποτελούνταν από υδρόφιλο κλάσμα, ενώ δεν βρέθηκαν καθόλου χουμικές ενώσεις. Στο υπόγειο νερό που ήταν ρυπασμένο, μόνο 16% ήταν το υδρόφιλο κλάσμα, το 50% από το DOC αποτελούνταν από φουλβικά οξέα. Οι



αναλογίες H/C στα απομονωμένα φουλβικά ήταν μεγαλύτερες για τα άπόμερα από ότι στα νερά των πηγών. Οι λόγοι N/C στα κλάσματα των χουμικών και φουλβικών ενώσεων βρέθηκαν πολύ υψηλότερες στα άπόμερα από ότι στα νερά των πηγών.

Στα άπόμερα και στα ρυπασμένα υπόγεια νερά ανιχνεύθηκαν με GC-MS, συγκεκριμένες ενώσεις όπως είναι το EDTA και τα αλκυλοφαινυλο πολυαιθοξυλικά (APECS).

1.4.3 Συμβολή της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης με ανιχνευτή πολλαπλών διόδων στην κλασμάτωση των αποβλήτων

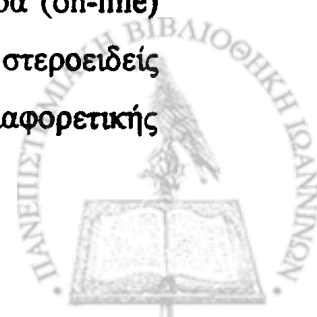
Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης με ανιχνευτή πολλαπλών διόδων έχει εφαρμοσθεί εκτενώς σε υγρά απόβλητα και νερά.

Σε βιομηχανικά απόβλητα προσδιορίστηκαν ¹¹⁴ με υγρή χρωματογραφία σε στήλη C18 με κλιμακούμενη σύσταση διαλυτών ύδατος-μεθανόλης και ανιχνευτή DAD τρεις ομάδες ενώσεων. Η πρώτη ομάδα περιέχει μη πολικές ενώσεις, η δεύτερη μέτριας πολικότητας ενώσεις και πολικές υποκατεστημένες αρωματικές ενώσεις και η τρίτη ομάδα περιέχει πολικές ανιλίνες και άλλες πολικές βάσεις. Για το διαχωρισμό και εμπλουτισμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν μικρές προστήλες πληρωμένες με C18, PRP1 και κατιονανταλλακτικά υλικά.

Σε περιβαλλοντικά δείγματα προσδιορίστηκαν ¹¹⁵ με HPLC-DAD φαινόλες-παράγωγα της λιγνίνης κατόπιν οξειδωσης των δειγμάτων με CuO. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η RP-18 στους 55°C, και η κινητή φάση ένα μίγμα φωσφορικού οξέος/ μεθανόλης/ ακετονιτρίλιου κλιμακούμενης σύστασης.

Σε απόβλητα πετροχημικών εφαρμόσθηκε ¹¹⁶ μία αναλυτική μέθοδος βασιζόμενη στη χρήση μίας συνδυασμένης SPME-HPLC τεχνικής. Χρησιμοποιήθηκαν ίνες από πολυ(διμεθυλοσιλοξάνιο) PDMS, στήλη C18 και εκλουστικό κλιμακούμενης σύστασης ακετονιτρίλιου/νερού. Προσδιορίστηκαν έξι πολυαρωματικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες.

Με μία πλήρως αυτοματοποιημένη διάταξη ¹¹⁷ βασιζόμενη στην σε σειρά (on-line) SPE με τη χρωματογραφία HPLC ανάστροφης φάσης προσδιορίστηκαν στεροειδείς ορμόνες και άλλες παρόμοιες συνθετικές ενώσεις σε δείγματα νερών διαφορετικής προέλευσης.



Για τον προσδιορισμό της γενοτοξικότητας σε διάφορα δείγματα απονέρων έγιναν διαχωρισμοί με on-line SPE, με HPLC ανάστροφης φάσης και ανιχνευτή απορρόφησης ¹¹⁸ UV-ακτινοβολίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη επιζήμιων ενώσεων σε αστικό απόβλητο που δεν απορροφούν στο UV χωρίς όμως να αναγνωριστεί η ταυτότητά τους. Το απόβλητο αυτό έδειξε πολύ υψηλή UV απορρόφηση. Στο βιομηχανικό απόβλητο, η απορρόφηση των αντίστοιχων ενώσεων είναι χαμηλότερη από αυτή των προτύπων ενώσεων και η επίδραση μετάλλαξης που προκαλείται είναι πολύ υψηλή ακόμη και σε χαμηλές θερμοκρασίες. Στο νοσοκομειακό απόβλητο, περιέχονταν πολυάριθμες ενώσεις με διαφορετικές πολικότητες, που δεν απορροφούν όλες στο UV και έχουν τοξικές και/ή γενοτοξικές ιδιότητες.

Δείγματα αποβλήτων χαρακτηρίστηκαν ¹¹⁹ με τεχνικές όπως SPE και με HPLC-DAD-MS. Ανιχνεύθηκαν φαινόλες, μη-ιοντικές τασιενεργές ενώσεις, βενζόλιο, γραμμικά αλκυλο-βενζοσουλφονικά άλατα, ναφθαλινοσουλφονικά άλατα και μικρορυπαντές που προκαλούν έντονες επιδράσεις ενδοκρινούς διαταραχής.

Με χρήση off-line SPE και ακολούθως με HPLC-DAD-ES-MS ανιχνεύθηκαν N-μεθυλοκαρβαμικά (aldicarb και carbofuran) καθώς και οι μεταβολίτες τους σε δείγματα ούρων ¹²⁰.

Πολλές εργασίες αναφέρονται στον προσδιορισμό ιοντικών τασιενεργών ενώσεων, αλκυλο φαινυλοαιθοξυλικών και εννυλο φαινολικών ενώσεων στα απόβλητα με ανάστροφης φάσης HPLC και ανιχνευτή DAD ¹²¹, καθώς και με UV ανιχνευτή ^{122,123,124}.



1.5 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ – ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ - ΧΡΟΝΟΣ ΠΑΡΑΜΟΝΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΠΟΒΑΗΤΩΝ

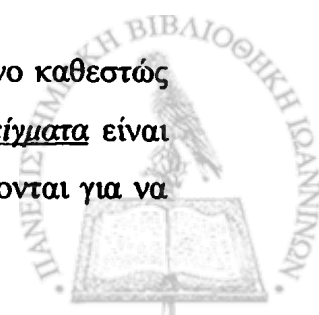
1.5.1 Αντιπροσωπευτικό δείγμα

Η λήψη αντιπροσωπευτικού δείγματος από λίμνη, κανάλι, στράγγισμα, δεξαμενή αποβλήτων είναι αντικείμενο έρευνας. Λόγω του μεγέθους και της μεταφοράς είναι αδύνατο να αναλυθεί για παράδειγμα μία ολόκληρη λίμνη, έτσι ένα μικρό μέρος του νερού της λίμνης λαμβάνεται για ανάλυση και το αποτέλεσμα θεωρείται να αντιπροσωπεύει όλο το νερό της λίμνης. Από αυτή την άποψη, κανένα δείγμα δεν είναι πραγματικά αντιπροσωπευτικό για το όλο σύστημα.

Μία απλή δειγματοληψία ονομάζεται δείγμα και δοκιμή¹²⁵. Πολλές αναλύσεις όπως αναλύσεις λιπών και ελαίων, υδρογονανθράκων πετρελαίου, διαλυμένου οξυγόνου, και πτητικών οργανικών ενώσεων μπορούν να γίνουν με την μέθοδο δειγματοληψίας δείγμα και δοκιμή. Ένα τέτοιο δείγμα χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένο χρόνο (λιγότερο από 15 λεπτά) και από το συγκεκριμένο σημείο λήψης του δείγματος. Ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα όλης της περιοχής απαιτεί την λήψη πολλών δειγμάτων για κάποιο χρονικό διάστημα, την ανάλυση του καθενός δείγματος και την εύρεση του μέσου όρου των αποτελεσμάτων.

Το αποτέλεσμα πολλαπλών δειγματοληψιών ως μέθοδος για να ληφθεί μία σφαιρική εικόνα της σύστασης του συστήματος τυποποιείται με σειρά μεταβλητών. Οι μεταβλητές πολλαπλής δειγματοληψίας ανάγονται στη λήψη ενός καθορισμένου μεγέθους δείγματος ανά μονάδα χρόνου, ή ανά μονάδα ροής, ή ανά μονάδα απόστασης από το ένα σημείο δειγματοληψίας στο επόμενο. Ο χρόνος της δειγματοληψίας καταγράφεται, όταν ένα δείγμα λαμβάνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα, από μία δεδομένη θέση δειγματοληψίας. Η μονάδα ροής αναφέρεται στον όγκο του υγρού που πρέπει να περάσει για να ληφθεί το επόμενο δείγμα από τη συγκεκριμένη θέση π.χ. μετά από κάθε 1000 γαλόνια. Η θέση δειγματοληψίας μπορεί να βρίσκεται είτε σε οριζόντια είτε σε κάθετη ροή, αλλά και οι δύο αναφέρονται σε καθορισμένη συχνότητα δειγματοληψίας.

Διαδοχικά δείγματα είναι τα δείγματα που λαμβάνονται υπό συγκεκριμένο καθεστώς που συντηρούνται και αναλύονται σαν ξεχωριστά δείγματα. Σύνθετα δείγματα είναι εκείνα που λαμβάνονται κάτω από διαφορετικές συνθήκες και αναμιγνύονται για να



ληφθεί ένα μέσο δείγμα, ενώ έπειτα επιμέρους δείγματα από το σύνθετο δείγμα αναλύονται για τις παραμέτρους που ενδιαφέρουν. Η πιο συνήθης κατάσταση είναι είτε η δειγματοληψία να γίνεται σε διαδοχικά χρονικά διαστήματα είτε υπό σταθερούς διαδοχικούς όγκους ροής.

Και τα διαδοχικά και τα σύνθετα δείγματα βρίσκονται στην επικράτεια ροής ή την επικράτεια χρόνου χρησιμοποιώντας αυτόματους δειγματολήπτες που έχουν σχεδιαστεί για να ψύχουν τα δείγματα αμέσως. Ένα επιφανειακό σύνθετο δείγμα λαμβάνεται από δείγματα που λαμβάνονται από μία περιοχή υπό τις ίδιες συνθήκες, έπειτα αναμιγνύονται για να ληφθεί το σύνθετο. Ένα κατακόρυφο σύνθετο δείγμα λαμβάνεται από δείγματα που λαμβάνονται σε διάφορα βάθη από ένα ή περισσότερα σημεία δειγματοληψίας. Το πιο σωστό σχήμα δειγματοληψίας είναι ένα συνολικό δείγμα, που χρησιμοποιεί μία ποικιλία διαφορετικών δειγματοληψιών με μία σαφή εικόνα της θέσης.

1.5.2 Δοχεία δειγμάτων

Τα δοχεία των δειγμάτων είναι συνήθως από βοριοπυριτικό γυαλί ή υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο (HDPE). Πρέπει να είναι καθαρά και να μην περιέχουν τις προς ανάλυση ενώσεις. Πρέπει να έχουν το κατάλληλο μέγεθος για να λαμβάνεται αρκετή ποσότητα δείγματος για τις αναλύσεις.

Μερικά δείγματα πρέπει να συλλέγονται σε διαφορετικά δοχεία, καθώς μία μόνο ανάλυση γίνεται από κάθε δοχείο.

Δείγματα που αναλύονται για πτητικές οργανικές ενώσεις πρέπει να λαμβάνονται εις διπλούν (ή καλύτερα εις τριπλούν) σε γυάλινα δοχεία με τεφλόν σιλικονούχο πάμα και χωρίς καθόλου ελεύθερο χώρο πάνω από το δείγμα (headspace).

Οι μη πτητικές οργανικές ενώσεις τοποθετούνται συνήθως σε γυάλινες φιάλες με τεφλόν σιλικονούχο πάμα.

Για τις μικροβιολογικές αναλύσεις πρέπει τα δείγματα να φυλάσσονται σε αποστειρωμένα δοχεία.

Τα μέταλλα συνήθως συλλέγονται σε δοχεία HDPE (υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο), αφού το γυαλί μπορεί να ανταλλάξει μεταλλοίοντα. Ο υδράργυρος στην στοιχειακή μορφή περνάει τα τοιχώματα του δοχείου και για τον λόγο αυτό καλύτερο είναι να συλλέγεται σε γυάλινες φιάλες.



1.5.3 Τρόποι συντήρησης των δειγμάτων

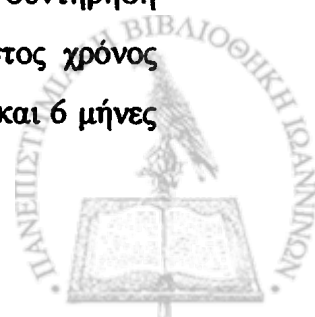
Η συντήρηση γίνεται για να μην αλλοιωθούν τα συστατικά του δείγματος. Τα στερεά δείγματα διατηρούνται μόνο με την ψύξη. Τα υδατικά δείγματα υπόκεινται σε ποικιλία τεχνικών συντήρησης, ανάλογα με τις προς ανάλυση ενώσεις. Συντηρητικά μπορεί να είναι διάφορα οξέα ή βάσεις για την ρύθμιση του pH, το ασκορβικό οξύ ή τα θειοθειικά για τη μείωση της δράσης του υπολειμματικού χλωρίου, καθώς και άλλα οξειδωτικά. Η θερμοκρασία συντήρησης είναι 4°C. Η συντήρηση μπορεί να περιλαμβάνει επίσης και τη φύλαξη των δειγμάτων στο σκοτάδι ή σε σκουρόχρωμα μπουκάλια.

Επίσης, προσοχή πρέπει να δοθεί για τυχόν μόλυνση του δείγματος από το εμφύπτισμα μιάς αντλίας (probe) ή μιας λωρίδας-δοκιμής για μία ποιοτική δοκιμή. Το καλύτερο είναι να ληφθούν δύο ιδανικά δείγματα για κάθε μία από τις αναλυτικές παραμέτρους, και έπειτα να χρησιμοποιηθεί το ένα από αυτά για να καθοριστούν οι απαιτήσεις συντήρησης.

1.5.4 Χρόνοι συντήρησης των δειγμάτων

Ο χρόνος συντήρησης πριν την ανάλυση έχει βασική σημασία. Οι ενώσεις που πρόκειται να αναλυθούν μπορεί να διασπασθούν και να χαθούν από το δείγμα με το χρόνο, ακόμα και αν αυτό συντηρείται σωστά. Όλες οι ενώσεις έχουν προτεινόμενους χρόνους συντήρησης που κυμαίνονται από μηδέν για το διαλυμένο οξυγόνο, τις 6 ώρες για τον προσδιορισμό των βακτηρίων (coliform), και μέχρι πάνω από 6 μήνες για τα βαρέα μέταλλα. Ο χρόνος διατήρησης ξεκινά να μετράται από τη στιγμή της δειγματοληψίας και τελειώνει με το ξεκίνημα της ανάλυσης. Δεν μετράται από το χρόνο που περνάει από την υποδοχή του δείγματος στο εργαστήριο μέχρι τη στιγμή της ανάλυσης.

Για τις περισσότερες αναλύσεις στα υγρά απόβλητα, οι φιάλες που προτείνονται είναι κυρίως οι γυάλινες αλλά και από πολυαιθυλένιο, η προτεινόμενη συντήρηση είναι για τις περισσότερες αναλύσεις η ψύξη στους 4°C, ενώ ο μέγιστος χρόνος συντήρησης κυμαίνεται από 48 ώρες για αναλύσεις όπως το BOD, μέχρι και 6 μήνες για στοιχεία όπως το βόριο.



1.6 ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η χημειομετρία, όπως περιγράφεται από τον Massart ¹²⁶, είναι η στρατηγική στη Χημεία που χρησιμοποιεί μαθηματικές, στατιστικές μεθόδους καθώς και την κοινή λογική με σκοπό α) να σχεδιαστούν ή να επιλεχθούν οι βέλτιστες συνθήκες της πειραματικής διαδικασίας, β) να παραχθούν οι πιο αξιόπιστες πληροφορίες από την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων, και γ) να ληφθούν ασφαλή συμπεράσματα για τη συμπεριφορά του χημικού συστήματος.

Συχνά, στην Αναλυτική Χημεία στοχεύουμε να εξακριβώσουμε τις μεταβλητές εκείνες που θα ξεχωρίσουν ένα σύνολο πολλών δειγμάτων σε διαφορετικές κατηγορίες με βάση τα δεδομένα που έχουν συλλεχθεί για τις μεταβλητές αυτές από τις μετρήσεις που έγιναν. Εάν έχουμε ένα σύνολο δειγμάτων και έχουν γίνει n μετρήσεις σε κάθε δείγμα, για να ξεχωρίσουν τα δείγματα μεταξύ τους, πρέπει να βρούμε μία χαρακτηριστική ιδιότητα του συστήματος.

Ανάλογα με την ιδιότητα (συνεχής, μη-συνεχής) ή τη δυνατότητα πρόβλεψης που θα εξετασθεί με βάση τις μετρήσεις σε κάποιο πλήθος δειγμάτων θα επιλεγθεί η πιο κατάλληλη τεχνική ανάλυσης των δεδομένων που θα εφαρμοσθεί. Γενικά οι τεχνικές αυτές είναι δύο ειδών: (α) αυτές που επεξεργάζονται δεδομένα κατηγορίας (category data), και (β) αυτές που επεξεργάζονται δεδομένα συνεχόμενων ιδιοτήτων (continuous property data).

Μία συνεχόμενη ιδιότητα είναι π.χ. μία εξαρτημένη μεταβλητή που συσχετίζεται με ένα δείγμα. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα της τεχνικής αυτής είναι η πολυμεταβλητή γραμμική συμμεταβολή (multivariate linear regression analysis) όπου η συνεχόμενη ιδιότητα (εξαρτημένη μεταβλητή) συσχετίζεται με ένα σύνολο μετρήσεων που αναφέρονται σε ανεξάρτητες μεταβλητές.

Η κατηγορία είναι ένα υποσύνολο δειγμάτων που ξεχωρίζει ανάμεσα στο σύνολο των δειγμάτων. Οι κατηγορίες είναι τελείως ανεξάρτητες ή μία από την άλλη ονομάζονται διακριτές (discrete categories), ενώ αυτές που παρουσιάζουν κάποια εξάρτηση ή μία από την άλλη ονομάζονται συνεχείς κατηγορίες (continuous categories). Στην ανάλυση λοιπόν των δεδομένων αυτών η ιδιότητα που μας ενδιαφέρει είναι εκείνη που σχετίζεται με την ταξινόμηση των δειγμάτων, όπου δεν μπορεί να εφαρμοσθεί η γραμμική συμμεταβολή. Το σύνολο των τεχνικών που σχεδιάστηκαν για να



βοηθήσουν στην ανάλυση n-διάστατων δεδομένων για την ταξινόμησή τους σε κατηγορίες ονομάζεται αναγνώριση αποτύπωσης συμπεριφοράς (pattern recognition).

1.6.1 Αναγνώριση αποτύπωσης συμπεριφοράς

Η αναγνώριση αποτύπωσης συμπεριφοράς (pattern recognition) είναι ένας από τους κλάδους της τεχνητής νοημοσύνης. Τεχνητή Νοημοσύνη είναι το πεδίο εκείνο που με τη βοήθεια ηλεκτρονικών υπολογιστών προσπαθεί να μιμηθεί ή να προσομοιάσει την ανθρώπινη νοημοσύνη. Η τεχνική της αναγνώρισης αποτύπωσης συμπεριφοράς με βάση μεγάλο αριθμό μεταβλητών για πάρα πολλά δείγματα, είναι πολύ δύσκολο να γίνει από τον άνθρωπο. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η χρήση του ηλεκτρονικού υπολογιστή.

Ο σκοπός είναι να εξακριβώσουμε και/ή να προβλέψουμε ένα συνδυασμό συνεισφοράς από τις μετρηθείσες μεταβλητές στα δείγματα που δεν είναι απευθείας μετρήσιμη, αλλά που θεωρείται ότι σχετίζεται έμμεσα με τις μετρήσεις μέσω κάποιας άγνωστης ή μη προσδιοριζόμενης σχέσης.

Στη Χημεία, η τεχνική της αναγνώρισης αποτύπωσης συμπεριφοράς άρχισε να εφαρμόζεται σε προβλήματα μετά το 1960^{127,128,129}. Με τον όρο σύνολο αντικειμένων (objects) εννοούμε τα πολλά δείγματα (samples) που λαμβάνονται και αντιπροσωπεύουν ένα σύστημα. Τα αντικείμενα μπορεί να είναι οτιδήποτε, από χημικές ενώσεις, δείγματα νερού, πρωτεϊνικά μόρια. Μεταβλητή (variable) είναι η ιδιότητα ή το χαρακτηριστικό του δείγματος που μπορεί να μετρηθεί και αντιπροσωπεύει έναν άξονα στον n-διάστατο χώρο. Παραδείγματα μεταβλητών είναι η συγκέντρωση ενός μετάλλου σε ένα δείγμα, ο δείκτης διάθλασης, η απορρόφηση στα 260 nm. Μία μέτρηση (measurement) είναι η τιμή που προσδιορίζεται πειραματικά και αντιστοιχεί σε μια από τις μεταβλητές.

Το επόμενο στάδιο στην αναγνώριση αποτύπωσης συμπεριφοράς είναι η μορφή των δεδομένων, τα οποία πρέπει να είναι συμβατά με την χρήση αλγορίθμων. Οι τεχνικές προεπεξεργασίας (preprocessing) δεδομένων έχουν σχεδιαστεί για να μετατρέψουν τα δεδομένα σε τέτοια μορφή ώστε να λαμβάνουμε περισσότερες και πιο αξιόπιστες πληροφορίες. Τα δεδομένα, λοιπόν, μετατρέπονται και ορίζονται πλέον ως χαρακτηριστικά (features) για να ξεχωρίζουν από τις αρχικές μεταβλητές.



Κατόπιν, θα πρέπει να αποφασιστεί πως θα παρουσιαστούν (*display*) τα δεδομένα σε δύο ή σε περισσότερες διαστάσεις, αλλά διατηρώντας όμως τον μέγιστο αριθμό πληροφοριών για τη δομή της βάσης δεδομένων όπως υπάρχει στον n -διάστατο χώρο. Η μάθηση χωρίς επίβλεψη (*unsupervised learning*), αναφέρεται σε μεθόδους που δεν κάνουν εκ των προτέρων υποθέσεις για τις κατηγορίες των δειγμάτων, αλλά βοηθούν τον αναλυτή να αποκαλύψει αποτυπώματα κατηγοριοποίησης αυτών με βάση τα δεδομένα.

Στη μάθηση με επίβλεψη (*supervised learning*) ο υπολογιστής μαθαίνει να ταξινομεί τα δείγματα βασιζόμενος σε εκ των προτέρων γνώση της κατηγορίας που υποδεικνύεται από τον χρήστη της τεχνικής. Ο σκοπός μιας τέτοιας μελέτης είναι να αναπτυχθεί ένας κανόνας ταξινόμησης ή ένας αλγόριθμος ώστε είτε να ελεγχθεί απλά η αξία της υπόθεσης, ή πέραν τούτου να μπορεί να ταξινομηθεί ένα άγνωστο δείγμα. Η επιτυχία στην αναγνώριση αποτύπωσης συμπεριφοράς εξαρτάται από ένα αριθμό προαπαιτούμενων. Πρέπει να έχουμε πολλά δείγματα από ένα σύστημα και πολλαπλές μετρήσεις υπό ταυτόσημες συνθήκες για το κάθε δείγμα. Για κάποιες τεχνικές ο λόγος του αριθμού των δειγμάτων προς τον αριθμό των μετρήσεων θα πρέπει να είναι τουλάχιστον τρία οπότε το σύστημα δεδομένων λέγεται υπερκαθορισμένο. Επιπλέον, οι τεχνικές αυτές δέχονται ότι η γειννίαση των σημείων στον n -διάστατο χώρο αντικατοπτρίζει και την ομοιότητα των ιδιοτήτων των δειγμάτων. Τέλος, τα στοιχεία θα πρέπει να ταξινομηθούν σε μία μήτρα δεδομένων, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα όπου η μέτρηση για κάθε δείγμα προβάλλεται σε μία σειρά.

$$\begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1,NV} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2,NV} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ x_{NP,1} & x_{NP,2} & \dots & x_{NP,NV} \end{bmatrix}$$

ΣΧΗΜΑ 1.10: Κατασκευή της μήτρας δεδομένων (όπου NP: ο αριθμός των δειγμάτων και NV: ο αριθμός των μεταβλητών)



1.6.1.1 Τεχνικές προεπεξεργασίας

Παραδείγματα τέτοιων τεχνικών περιλαμβάνουν το εσωτερικό γινόμενο (scalar product), την κανονικοποίηση, και επεκτείνονται μέχρι την λογαριθμική μετατροπή σε ιδιοδιανύσματα (eigenvectors), δηλαδή, οποιαδήποτε μαθηματική επεξεργασία γίνεται στα αρχικά δεδομένα για να ενισχυθεί η παρουσίαση των πληροφοριών. Ο τύπος της τεχνικής που θα ακολουθηθεί εξαρτάται από το περιεχόμενο του προβλήματος: το σκοπό και/ή τις ερωτήσεις, τους χημικούς παράγοντες, ακόμη και την κοινή λογική. Επίσης, εξαρτάται από το αν τα δεδομένα είναι από μία πηγή (single-source), δηλαδή αν προέρχονται από ένα όργανο, ή από πολλαπλές πηγές (multi-source), δηλαδή από μία ποικιλία οργάνων. Παράδειγμα μιας πηγής δεδομένων είναι η φασματοσκοπία, αφού οι μετρήσεις σε ένα δείγμα γίνονται με σάρωση του φάσματος.

1.6.1.2 Μέθοδοι παρουσίασης

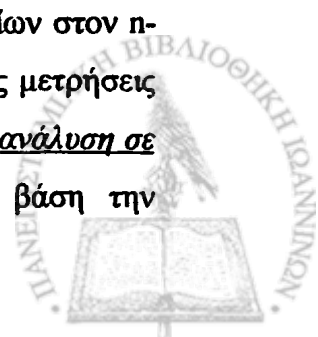
Οι μέθοδοι παρουσίασης των n -διάστατων σημείων που προκύπτουν από τα n -διάστατα δεδομένα σε δύο διαστάσεις, για να μελετηθούν είναι πολύ σημαντικές για δύο λόγους: α) επιτρέπουν το χρήστη που θέλει την αναγνώριση αποτύπωσης συμπεριφοράς να αναλύσει ευκολότερα τα δεδομένα, και β) παρέχουν ένα τρόπο στο χρήστη να κατευθύνει και να επιβλέπει την εφαρμογή άλλων αλγορίθμων.

Οι γραμμικές μέθοδοι παρουσίασης (linear methods) ονομάζονται συνήθως προβολές (projections). Οι άξονες που χρησιμοποιούνται είναι γραμμικοί συνδυασμοί των αυθεντικών χαρακτηριστικών.

Οι μη γραμμικές μέθοδοι παρουσίασης (Nonlinear methods) που αναφέρονται και ως χάρτες (mappings) παράγουν εκθέσεις των οποίων τα συστήματα είναι μη γραμμικοί συνδυασμοί των αυθεντικών μεταβλητών.

1.6.1.3 Μάθηση χωρίς επίβλεψη

Οι περισσότερες τεχνικές βασίζονται στην ιδέα εύρεσης συστάδων σημείων στον n -διάστατο χώρο συστήματος ορθογωνίων αξόνων που προκύπτουν από τις μετρήσεις των χαρακτηριστικών των δειγμάτων, και γι' αυτό προέκυψε και ο όρος ανάλυση σε συστάδες. Τα σημεία κατηγοριοποιούνται σε ομάδες (συστάδες) με βάση την



γεινίαση ή ομοιότητά τους. Θεωρούμε ότι όσο πιο κοντά είναι τα σημεία στον n -διάστατο χώρο, τόσο περισσότερο μοιάζουν τα χαρακτηριστικά τους.

1.6.1.4 Μάθηση με επίβλεψη

Με την τεχνική αυτή υπάρχει εκ των προτέρων η γνώση (ή η θεώρηση) για την ταξινόμηση των δειγμάτων σε κατηγορίες και η γνώση αυτή χρησιμοποιείται για να αναπτυχθεί ο κανόνας ταξινόμησης. Ο σκοπός της τεχνικής αυτής είναι να προβλέψει την κατηγορία που ανήκουν άγνωστα δείγματα. Η μάθηση γίνεται μέσω ενός συνόλου εκπαίδευσης (training set) που είναι δείγματα γνωστών κατηγοριών. Ένα σύνολο εκτίμησης (evaluation set) χρησιμοποιείται για να εκτιμήσει την επιτυχία της πρόβλεψης συγκρίνοντάς την με την πραγματική. Ένα σύνολο δοκιμής (test set) αποτελείται από δείγματα όπου δεν γνωρίζουμε σε ποια κατηγορία ανήκουν.

Συνήθως, κάποιος ξεκινά τη μελέτη με ένα σύνολο εκπαίδευσης και πρέπει να αποφασίσει ποια μέθοδο θα διαλέξει για να διατηρήσει κάποια από τα δείγματα ώστε να χρησιμοποιηθούν ως σύνολο εκτίμησης της πρόβλεψης. Μία αποτελεσματική μέθοδος είναι η μέθοδος που βγάζει ένα έξω σε κάθε ένα του συνόλου εκπαίδευσης (leave-one-out).

Άλλη σημαντική θεώρηση στη μελέτη κατηγοριοποίησης είναι να προσδιορίσουμε τον ελάχιστο αριθμό μεταβλητών που είναι απαραίτητες και επαρκείς για να ταξινομήσουμε σωστά το σύνολο εκπαίδευσης. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται επιλογή χαρακτηριστικών και έχει το πλεονέκτημα όχι μόνο ότι αυξάνεται η απόδοση και μειώνεται το κόστος αλλά και ο χρόνος των χημικών αναλύσεων αλλά και το ότι παρέχει ανατροφοδότηση (feedback) στον πειραματικό σχεδιασμό.

Η μάθηση γίνεται με διάφορους τρόπους που αναφέρονται παρακάτω:

A) Γραμμική μηχανή εκπαίδευσης. Η γραμμική μηχανή εκπαίδευσης χρησιμοποιεί μία γραμμική σχέση διαχωρισμού των κατηγοριών ως βάση για την κατηγοριοποίηση.

B) K-κοντινότερος γείτονας. Η μέθοδος του K-κοντινότερου γείτονα είναι πιο απλή μέθοδος καθώς ένα άγνωστο δείγμα κατηγοριοποιείται σύμφωνα με την πλειονότητα των K-κοντινότερων γειτόνων του συνόλου εκπαίδευσης στον n -διάστατο χώρο. Η γεινίαση μετράται με το κατάλληλο μετρικό σύστημα αποστάσεων όπως και στην εκπαίδευση χωρίς επίβλεψη.



1.6.1.5 Διασταυρούμενη επικύρωση (αξιολόγηση)

Η μέθοδος της διασταυρούμενης επικύρωσης (cross validation) αποτελεί μέθοδο εξέτασης της στατιστικής σημαντικότητας των ιδιοδιανυσμάτων και χρησιμοποιείται για να υπολογισθεί η απόδοση της κατηγοριοποίησης ¹³⁰. Η μέθοδος γίνεται με μία επαναληπτική διαδικασία κατά την οποία διαγράφονται στοιχεία της μήτρας των δεδομένων κατά προδιαγραφμένο τρόπο. Μερικές εκδοχές της διασταυρούμενης επικύρωσης απλά διαγράφουν το 10% των διανυσμάτων δεδομένων. Συνήθως, είναι προτιμότερο να διαγραφούν οι διαγώνιες γραμμές των στοιχείων της μήτρας δεδομένων.

1.6.2 Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα

1.6.2.1 Νευρωνικοί υπολογισμοί

Τεχνητό νευρωνικό δίκτυο (ΤΝΔ) είναι ένα δίκτυο που αποτελείται από εισόδους, εξόδους και ένα πλήθος διασυνδεδεμένων μονάδων που ονομάζονται τεχνητοί νευρώνες ^{131,132,133}. Το δίκτυο εξομοιώνει τη βιολογική λειτουργία του ανθρώπινου μυαλού. Η κάθε μονάδα χαρακτηρίζεται από εισόδους και εξόδους και υλοποιεί μια απλή μαθηματική συνάρτηση. Οι μονάδες συνδέονται μεταξύ τους με μία τιμή βάρους. Οι τιμές των βαρών των συνδέσεων αποτελούν τη γνώση που βρίσκεται αποθηκευμένη στο δίκτυο και καθορίζουν τη λειτουργικότητά του. Η έξοδος κάθε μονάδας καθορίζεται από τον τύπο της μονάδας, τη διασύνδεση με τις υπόλοιπες μονάδες και πιθανώς και κάποιες εξωτερικές εισόδους. Πέρα από μία πιθανή δεδομένη (εκ κατασκευής) λειτουργική ικανότητα ενός δικτύου, συνήθως ένα δίκτυο αναπτύσσει μία συνολική λειτουργικότητα μέσω μιας μορφής εκπαίδευσης.

Η συνολική λειτουργικότητα ενός τεχνητού λειτουργικού δικτύου καθορίζεται από την τοπολογία του δικτύου, τα χαρακτηριστικά των νευρώνων, τη μέθοδο εκπαίδευσης και από τα δεδομένα με τα οποία γίνεται η εκπαίδευση αυτή. Ο υπολογισμός που εκτελεί ο κάθε νευρώνας είναι απλός και κοινός για όλους τους νευρώνες. Επειδή οι νευρώνες λειτουργούν παράλληλα και ταυτόχρονα και ο αριθμός



τους μπορεί να είναι πολύ μεγάλος, τα ΤΝΔ αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα μαζικού παράλληλου υπολογισμού.

1.6.2.2 Λειτουργία του βιολογικού συστήματος

Η λειτουργία του βιολογικού συστήματος βασίζεται στη διασύνδεση εξειδικευμένων κυττάρων του νευρικού συστήματος που ονομάζονται βιολογικοί νευρώνες. Σημαντικές ιδιότητες των βιολογικών συστημάτων, όπως είναι η προσαρμοστικότητα, η ικανότητα αναγνώρισης από τα συμφραζόμενα, η ανοχή στα λάθη, η μεγάλη χωρητικότητα μνήμης, μας βοηθούν στη μελέτη και στην προσπάθεια να εξομοιώσουμε αυτά με εναλλακτικές τεχνικές. Βέβαια, δεν είναι ακόμη γνωστός ο τρόπος που λειτουργεί ο ανθρώπινος εγκέφαλος. Αν και η επεξεργασία που κάνει ο ανθρώπινος εγκέφαλος είναι σχετικά αργή σε σχέση με τα τεχνητά ηλεκτρονικά συστήματα που γίνεται σε μερικές εκατοντάδες χιλιοστά του δευτερολέπτου (msec). Έτσι, συμπεραίνουμε ότι η βάση του βιολογικού υπολογισμού είναι ένας μικρός αριθμός διαδοχικών βημάτων, καθένα από τα οποία εκτελείται με πολλές παράλληλες πορείες. Επιπλέον, στη βιολογική αυτή αρχιτεκτονική η κάθε μονάδα επεξεργασίας είναι σχετικά απλή και τοπικά συνδεδεμένη. Βασική λειτουργία ενός βιολογικού νευρώνα είναι η συσσώρευση των σημάτων που δέχεται από τους νευρώνες με τους οποίους συνδέεται η είσοδός του, το φιλτράρισμα και η ενίσχυση αυτών των σημάτων καθώς και η παραγωγή ενός σήματος εξόδου το οποίο στη συνέχεια μεταδίδεται μέσω των συνάψεων με τους νευρώνες με τους οποίους συνδέεται η έξοδός του. Πολύ σημαντικό στοιχείο είναι η επίδραση ενός νευρώνα στους γειτονικούς του η οποία μπορεί να είναι είτε διεγερτική (θετική σύνδεση) είτε ανασταλτική (αρνητική σύνδεση). Σε πλήρη αντιστοιχία με το απλοποιημένο αυτό μοντέλο ενός βιολογικού νευρώνα αναπτύχθηκε το μοντέλο ενός τεχνητού νευρώνα.

Αν θεωρήσουμε έναν τεχνητό νευρώνα με d συνδέσεις εισόδου x_1, x_2, \dots, x_d με αντίστοιχες τιμές βαρών, w_1, w_2, \dots, w_d . Ο υπολογισμός που εκτελεί ένας νευρώνας γίνεται σε δύο στάδια:

Το πρώτο στάδιο εκτελεί τον υπολογισμό της ενεργοποίησης με βάση την σχέση,

$$u = \sum_{i=1}^d w_i x_i + \theta$$

όπου θ η πόλωση του νευρώνα.



Το δεύτερο στάδιο εκτελεί τον υπολογισμό της εξόδου y του τεχνητού νευρώνα περνώντας την ενεργοποίηση u μέσα από μία συνάρτηση ενεργοποίησης f :

$$y = f(u)$$

Η συνάρτηση ενεργοποίησης είναι συνήθως μη γραμμική και στις περισσότερες περιπτώσεις σιγμοειδής.

Δύο τύποι σιγμοειδών συναρτήσεων είναι:

Η *λογιστική*:

$$f(u) = \frac{1}{1 + e^{-gu}}$$

που παρέχει τιμές στο $(0,1)$ και είναι μια παράμετρος που καθορίζει την κλίση της σιγμοειδούς.

Η *υπερβολική εφαπτομένη*:

$$f(u) = \tanh(gu)$$

- που παρέχει τιμές στο $(-1,1)$.

1.6.2.3 Βασικές αρχές Νευρωνικών Δικτύων

Ένα νευρωνικό δίκτυο αποτελείται από απλές μονάδες επεξεργασίας που ονομάζονται τεχνητοί νευρώνες. Οι νευρώνες είναι τοποθετημένοι σε επίπεδα. Το πρώτο επίπεδο λέγεται επίπεδο εισόδου (input) διότι δέχεται τα εισερχόμενα σήματα. Το τελευταίο επίπεδο ονομάζεται επίπεδο εξόδου (output) διότι από αυτό το επίπεδο βγαίνουν τα σήματα από τον τεχνητό νευρώνα προς την έξοδο. Τα επίπεδα που βρίσκονται μεταξύ των δύο αυτών επιπέδων ονομάζονται κρυμμένα επίπεδα. Μπορεί να υπάρχουν ένα ή περισσότερα κρυμμένα επίπεδα και ο αριθμός των νευρώνων σε καθένα από αυτά αποτελεί σημαντική παράμετρο του δικτύου. Οι νευρώνες αλληλεπιδρούν μέσω συνδέσεων με βάρη. Κάθε σύνδεση μεταξύ δύο νευρώνων του δικτύου χαρακτηρίζεται από μια τιμή βάρους (w_i). Επιπλέον κάθε νευρώνας χαρακτηρίζεται και από μια επιπλέον παράμετρο που ονομάζεται πόλωση θ . Στην τυπική περίπτωση κάθε νευρώνας υπολογίζει το εσωτερικό γινόμενο του διανύσματος των σημάτων που δέχεται από τους άλλους νευρώνες με τους οποίους συνδέεται επί το διάνυσμα των βαρών των συνδέσεων εισόδου και στο αποτέλεσμα προστίθεται η τιμή της πόλωσης. Το αποτέλεσμα που προκύπτει εφαρμόζεται ως όρισμα στη συνάρτηση ενεργοποίησης και προκύπτει η τελική έξοδος του νευρώνα.



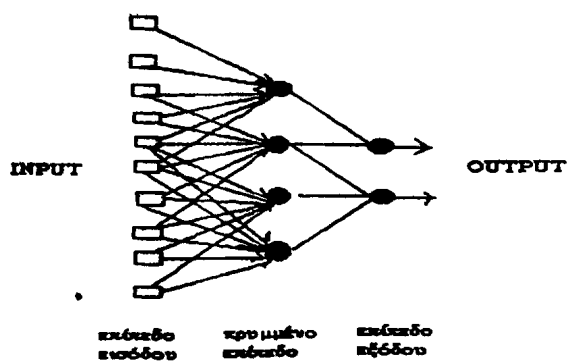
Η βελτιστοποίηση του δικτύου προσεγγίζεται εμπειρικά δοκιμάζοντας ποικίλες πιθανότητες και επιλέγοντας εκείνη που θα παρέχει την καλύτερη συμφωνία μεταξύ πόλωσης (bias) και παραλλακτικότητας (variance).

Τα στοιχεία της εισόδου ενός νευρώνα μπορεί να είναι είτε εξωτερικές εισοδοί στο δίκτυο (για το επίπεδο εισόδου) ή έξοδοι άλλων νευρώνων (για τα επίπεδα εξόδου και το κρυμμένο). Ο νευρώνας συσσωρεύει τις εισόδους αυτές και χρησιμοποιώντας μια μαθηματική συνάρτηση μετασχηματισμού γνωστή ως συνάρτηση μεταφοράς, τις μετατρέπει σε συσσωρευμένη είσοδο στο εξωτερικό επίπεδο του νευρώνα. Το στρώμα αυτό καταλήγει κυρίως σε έναν αριθμό συνδέσεων για να δώσει είσοδο σε άλλο επίπεδο νευρώνων.

Το υπολογιστικό μοντέλο αποτελείται από συνδέσεις νευρωνικών στοιχείων ή μονάδων. Οι συνδέσεις όμως χαρακτηρίζονται από τα βάρη τους που αρχικά είναι αυθαίρετα ενώ συγκεκριμενοποιούνται στα χαρακτηριστικά βάρη της κατηγορίας που ανήκουν τα δείγματα με τη μάθηση. Στα σχήματα 1.11 και 1.12 απεικονίζονται δύο παραδείγματα δικτύων μικρής κλίμακας στα οποία οι μονάδες παρουσιάζονται με κύκλους και οι συνδέσεις με τόξα. Στο σχήμα 1.11 απεικονίζεται ένα μη-ανατροφοδοτούμενο δίκτυο, δηλαδή δίκτυο που δεν περιέχει κλειστά μονοπάτια από συνδέσεις. Στο σχήμα 1.12 αντιθέτως, παρουσιάζεται η αρχιτεκτονική της ανατροφοδότησης η οποία επιτρέπει την ύπαρξη κλειστών πορειών σύνδεσης μεταξύ των μονάδων. Η αρχιτεκτονική αυτή προσφέρει στο δίκτυο πολύ περισσότερες δυνατότητες, αλλά είναι όμως πιο δύσκολη η μαθηματική αντιμετώπισή της. Επίσης, πρέπει να αναφερθεί ότι η τοπολογία των δικτύων μπορεί να είναι είτε στατική είτε δυναμική (μεταβαλλόμενη). Τέλος, οι μονάδες που δεν συνδέονται με την έξοδο ονομάζονται κρυμμένες (hidden) ή εσωτερικές.

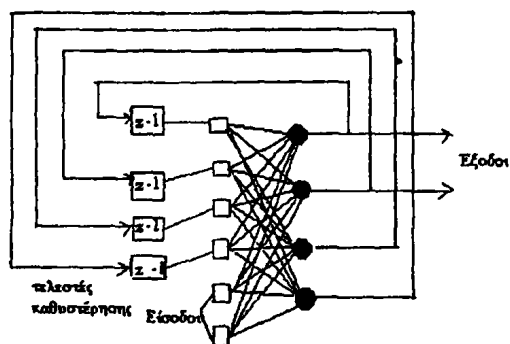
Κάθε μονάδα υλοποιεί μία συνάρτηση τοπικά και όλο το δίκτυο υλοποιεί μία συγκεκριμένη λειτουργία. Στις περισσότερες περιπτώσεις η κάθε εφαρμογή είναι αυτή που καθορίζει την υπολογιστική διαδικασία μέσω των απαιτήσεών της. Ο καθορισμός των παραμέτρων του δικτύου (τιμών των βαρών) που θα ικανοποιούν αυτές τις απαιτήσεις επιτυγχάνεται μέσω της διαδικασίας εκπαίδευσης (learning). Η γνώση, η εμπειρία και η εκπαίδευση του δικτύου αποθηκεύεται στις διασυνδέσεις των μονάδων και τις τιμές των βαρών.





ΣΧΗΜΑ 1.11: Ένα τυπικό νευρωνικό δίκτυο πρόσθιας τροφοδοσίας

Τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα (ΤΝΔ) στην πλειοψηφία τους εκπαιδεύονται με σκοπό να αποκτήσουν μία γενικότερη ικανότητα κατηγοριοποίησης, ώστε να μπορούν να προβλέψουν όταν τους ζητηθεί να αναγνωρίσουν ή να κατηγοριοποιήσουν δεδομένα άγνωστων δειγμάτων.



ΣΧΗΜΑ 1.12: Ένα τυπικό νευρωνικό επαναληπτικό δίκτυο

Αυτός είναι και ο αντικειμενικός σκοπός της διαδικασίας εκπαίδευσης, να αναπτύξει το ΤΝΔ την κατάλληλη εσωτερική δομή, ώστε να αναγνωρίσει πρότυπα που θα μοιάζουν με αυτά στα οποία έχει εκπαιδευτεί. Η εκπαίδευση των ΤΝΔ γίνεται τόσο με τεχνικές μάθησης με επίβλεψη, όσο και με τεχνικές μάθησης χωρίς επίβλεψη.

1.6.2.4 Εφαρμογές των Νευρωνικών Δικτύων

Α. Χαρακτηριστικά των κατάλληλων προβλημάτων για επίλυση με ΤΝΔ

Η εξομοίωση των βιολογικών υπολογιστικών παραδειγμάτων που γίνεται μέσω ΤΝΔ σε πολλές περιπτώσεις έχει πολύ καλά αποτελέσματα. Οι κατηγορίες προβλημάτων που έχει δείξει επιτυχίες είναι οι εξής:

- Η κατηγορία των προβλημάτων που περιλαμβάνουν προβλήματα δρομολόγησης, αναζήτησης, κλπ.
- Η κατηγορία των προβλημάτων αναγνώρισης (π.χ. φωνής, εικόνας, κλπ.)
- Η κατηγορία των προβλημάτων ελέγχου των οποίων τα δεδομένα είναι ελλιπή, ασαφή και στοχαστικά.

Όλα αυτά τα προβλήματα χαρακτηρίζονται από την πολυπλοκότητα, τον πολυδιάστατο χώρο τους και τις άγνωστες συσχετίσεις μεταξύ των μεταβλητών τους.

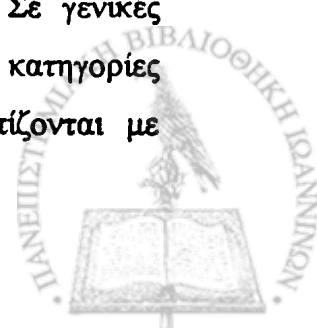


B. Παραδείγματα εφαρμογών ΤΝΔ

- Επεξεργασία εικόνας και μηχανική όραση (π.χ. ταίριασμα εικόνας, προεπεξεργασία, κατάτμηση, ανάλυση, συμπίεση εικόνας και επεξεργασία χρονικά μεταβαλλόμενων εικόνων).
- Επεξεργασία σήματος (π.χ. ανάλυση και μορφολογία σεισμικού σήματος).
- Αναγνώριση προτύπων (π.χ. εξαγωγή χαρακτηριστικών, ανάλυση και κατηγοριοποίηση σήματος ραντάρ, αναγνώριση φωνής, κειμένου, χειρονομιών και πιστοποίηση ταυτότητας).
- Ιατρική ¹³⁴ (π.χ. ανάλυση ηλεκτροκαρδιογραφήματος, ιατρική διάγνωση και επεξεργασία ιατρικής εικόνας)
- Αμυντικά συστήματα (π.χ. υποβρύχια ανίχνευση ναρκών).
- Οικονομία (π.χ. ανάλυση αγοράς μετοχών, ασφάλεια συναλλαγών, εκτίμηση φερεγγυότητας δανειζόμενου πελάτη, εκτίμηση ακίνητης περιουσίας).
- Σχεδίαση, έλεγχο και αναζήτηση (π.χ. παράλληλη υλοποίηση NP προβλημάτων, αυτόματος έλεγχος, ρομποτική).
- Τεχνητή νοημοσύνη (π.χ. υλοποίηση έμπειρων συστημάτων).
- Δυναμικά εξελισσόμενα συστήματα, πρόβλεψη χρονοσειρών (π.χ. εκτίμηση κατάστασης συστήματος, ανίχνευση βλαβών και ανάκαμψη).
- Επικοινωνία ανθρώπου-υπολογιστή
- Χημεία (π.χ. για τον εντοπισμό των μη σημειακών πηγών ρύπανσης από μικροβιολογικές παραμέτρους ¹³⁵, για την πρόβλεψη της συγκέντρωσης αζώτου ¹³⁶ και φωσφόρου ¹³⁷ περιοχών από τις οικολογικές μεταβλητές (χαρακτηριστικά τους, για την μελέτη της ποιότητας των επιφανειακών νερών ¹³⁸, καθώς και σε άλλες εφαρμογές ^{139,140,141})
- Οικολογία ¹⁴²⁻¹⁴⁵

1.6.2.5 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των ΤΝΔ

Επειδή τα ΤΝΔ είναι ένα σχετικά πρόσφατο μοντέλο υπολογισμού, τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους δεν έχουν ακόμη ξεκαθαριστεί πλήρως. Σε γενικές γραμμές είναι κατάλληλα να αντιμετωπίσουν συγκεκριμένες κατηγορίες προβλημάτων και ιδίως τα προβλήματα εκπαίδευσης που αντιμετωπίζονται με



συσχέτιση προτύπων. Δεν μπορούμε να πούμε ότι τα ΤΝΔ μπορούν να λύσουν όλα τα προβλήματα αυτόματης απόκτησης γνώσης.

Πλεονεκτήματα

- Έμφυτος παραλληλισμός
- Ανοχή σε σφάλματα (λόγω του παραλληλισμού)
- Σχεδιασμένα να είναι προσαρμόσιμα
- Δεν υπάρχει ανάγκη για χαρακτηρισμό του προβλήματος πέρα από το σύνολο των προτύπων (δειγμάτων) εκπαίδευσης

Μειονεκτήματα

- Δεν υπάρχουν σαφείς κανόνες για την ανάπτυξη ΤΝΔ για οποιαδήποτε εφαρμογή
- Δεν υπάρχει γενικός τρόπος για την ερμηνεία της εσωτερικής λειτουργίας του δικτύου
- Η εκπαίδευση μπορεί να είναι δύσκολη έως αδύνατη
- Η ικανότητα γενίκευσης είναι δύσκολα προβλέψιμη

1.6.2.6 Τρόποι κατασκευής των ΤΝΔ

Δεν έχει ακόμη επιτευχθεί η ανάπτυξη μιας συστηματικής μεθοδολογίας για την κατασκευή των νευρωνικών δικτύων για την επίλυση κάποιου προβλήματος.

Πρέπει να απαντηθούν ερωτήματα όπως: α) είναι οι τεχνικές των ΤΝΔ κατάλληλες για επίλυση του προβλήματος; Το πρόβλημα έχει μία ή περισσότερες λύσεις; β) μπορούμε να λύσουμε το πρόβλημα τροποποιώντας γνωστά ΤΝΔ; γ) μπορεί να αναλυθεί το πρόβλημα;

Η εφαρμογή της τεχνολογίας νευρωνικών δικτύων απαιτεί τον καθορισμό των τεχνολογικών στοιχείων του ΤΝΔ, όπως της αρχιτεκτονικής, της τοπολογίας, των αλγορίθμων των μονάδων και της διαδικασίας εκπαίδευσης. Αν και φαίνεται απλό χρειάζεται αρκετή τεχνική κρίση. Υπάρχουν άπειροι συνδυασμοί που είναι αδύνατο να δοκιμασθούν όλοι. Επιπλέον πρέπει να εξετασθεί η καταλληλότητα της νευρωνικής λύσης.

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης λύσεων με ΤΝΔ προκύπτουν ερωτήματα όπως:

- Είναι δυνατόν να εκπαιδευτεί το ΤΝΔ για να εκτελέσει την επιθυμητή λειτουργία;
- Εάν υποθέσουμε ότι υπάρχει λύση, ποιες είναι οι παράμετροι του δικτύου;
- Τι υπολογιστικοί πόροι είναι απαραίτητοι;



Για πραγματικές εφαρμογές η σχεδίαση του ΤΝΔ είναι πολύπλοκη και συνήθως γίνεται διαδραστικά (interactively) και επαναληπτικά. Παρότι είναι αδύνατον να παρέχουμε έναν ολοκληρωμένο μενού, μία διαδικασία βημάτων που αντανακλά τα βασικά στάδια υλοποίησης είναι η παρακάτω

- Τοπολογία δικτύου και στρατηγική διασύνδεσης των μονάδων
- Χαρακτηριστικά των μονάδων (μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τη θέση τους)
- Διαδικασία εκπαίδευσης
- Σύνολα εκπαίδευσης και ελέγχου
- Αναπαράσταση εισόδου/εξόδου, προεπεξεργασία και μετεπεξεργασία

1.6.2.7 Κατηγορίες ΤΝΔ με βάση τη δομή τους

Οποιαδήποτε περιγραφή ενός ΤΝΔ ξεκινάει με τον προσδιορισμό των εξής χαρακτηριστικών

A) Τοπολογία δικτύου

Με βάση την τοπολογία και τη δομή των ΤΝΔ μπορούμε να ξεχωρίσουμε τους παρακάτω τύπους:

- Επαναληπτικά δίκτυα (με συνδέσεις ανάδρασης)
- Δίκτυα πρόσθιας τροφοδότησης (feedforward)
- Δίκτυα με δομή επιπέδων ή ιεραρχική
- Δίκτυα με ανταγωνιστικές (competitive) συνδέσεις

B) Χαρακτηριστικά μονάδων

Γ) Λειτουργικότητα του δικτύου.

Μία προσέγγιση στο διαχωρισμό των ΤΝΔ προκύπτει από την επιθυμητή συνεισφορά που θέλουμε αυτό να παρουσιάσει. Για παράδειγμα, η επιθυμητή λειτουργία ενός ΤΝΔ μπορεί να καθοριστεί με απαρίθμηση των καταστάσεων του δικτύου ή προσδιορίζοντας την επιθυμητή έξοδο βάσει των εισόδων και της τρέχουσας κατάστασης. Τα ΤΝΔ χωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες:

- Συσχετιστές προτύπων. Η λειτουργία αυτού του δικτύου είναι η συσχέτιση προτύπων και η υλοποίηση επιθυμητών απεικονίσεων εισόδου-εξόδου. Συνήθως, υλοποιούνται με δίκτυα πρόσθιας τροφοδότησης
- Μοντέλο μνήμης συμφραζομένων.



- Αυτοοργανούμενα (self-organized) δίκτυα. Εδώ, ανήκουν τα δίκτυα μάθησης χωρίς επίβλεψη, τα οποία κατηγοριοποιούν την είσοδο σύμφωνα με κάποια κριτήρια ομοιότητας.

1.6.2.8 Εκπαίδευση των ΤΝΔ

Η εκπαίδευση, ορίζεται σε γενικές γραμμές ως η κατάλληλη χρήση πληροφοριών για τη βελτίωση της συμπεριφοράς ενός συστήματος. Στην πιο συνηθισμένη περίπτωση των προβλημάτων απεικόνισης (συσχέτισης προτύπων εισόδου-εξόδου) η εκπαίδευση μπορεί να οριστεί ως η τροποποίηση των παραμέτρων (βαρών) του ΤΝΔ, ούτως ώστε χρησιμοποιώντας ένα σύνολο δεδομένων, να πλησιάσουμε σταδιακά την επιθυμητή συμπεριφορά συγκρίνοντας την τρέχουσα απόκριση του δικτύου με την επιθυμητή απόκριση.

Σύνολα εκπαίδευσης και ελέγχου

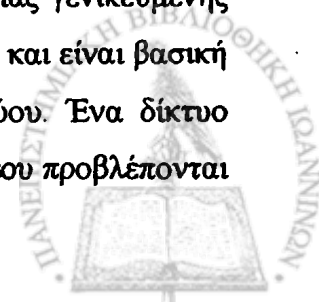
Υποθέτουμε ότι έχουμε ένα σύνολο δεδομένων απεικόνισης εισόδου/εξόδου ή μόνο εισόδου τα οποία καθορίζουν την επιθυμητή συμπεριφορά του δικτύου. Το σύνολο αυτό το παριστάνουμε με H και το ονομάζουμε *σύνολο εκπαίδευσης* (training set).

Στην εκπαίδευση με επίβλεψη το H μας δίνει πληροφορίες για τη συσχέτιση των εισόδων (I) με τις εξόδους (O), δηλαδή αποτελείται από ζεύγη της μορφής (I_i, O_i) , $i = 1, \dots, n$ (στη γενική περίπτωση τα I_i και O_i είναι διανύσματα). Επίσης, πρέπει να διευκρινήσουμε ότι το σύνολο αυτό περιέχει ένα μικρό γενικά αριθμό ζευγών σε σχέση με το σύνολο των άπειρων πιθανών ζευγών.

Το *σύνολο αξιολόγησης* H' (evaluation set) αποτελείται πάλι από ζεύγη της μορφής (I_i, O_i) . Μεταξύ των δύο συνόλων όμως, δεν υπάρχει κοινή τομή. Το σύνολο αυτό χρησιμοποιείται μετά το τέλος της εκπαίδευσης για να διαπιστωθεί η ικανότητα γενίκευσης του ΤΝΔ σε δεδομένα με τα οποία δεν έχει ήδη εκπαιδευτεί.

Στην εκπαίδευση χωρίς επίβλεψη, τα δεδομένα του H δεν είναι απεικονίσεις εισόδου/εξόδου αλλά μόνον δεδομένα εισόδου I_i . Στην περίπτωση αυτή το δίκτυο πρέπει να καταλήξει στην εξαγωγή κάποιων βασικών ιδιοτήτων των δεδομένων του H (π.χ. εύρεση ομάδων).

Η εσωτερική αυτή διαδικασία της αυτοοργάνωσης ή η ανάπτυξη μιας γενικευμένης παρουσίας του συστήματος είναι γνωστή ως εκπαίδευση (training) και είναι βασική για μια αποτελεσματική φάση πρόβλεψης ενός νευρωνικού δικτύου. Ένα δίκτυο θεωρείται καλά εκπαιδευμένο όταν η απόκλιση μεταξύ των εξόδων που προβλέπονται



από το δίκτυο και των εξόδων που μελετούνται βρίσκεται σε ανεκτά όρια. Σημαντικός παράγοντας για την καλή εκπαίδευση του δικτύου είναι ο αριθμός των μονάδων που βρίσκονται στο κρυμμένο στρώμα. Εάν υπάρχουν λίγες μονάδες δεν υπάρχουν ίσως αρκετές ευκαιρίες για το δίκτυο να εκπαιδευτεί. Πολλές κρυμμένες μονάδες δεν απαιτούν μόνο αρκετό χρόνο για τον υπολογισμό αλλά μπορεί να οδηγήσουν και σε υπερεκπαίδευση (over training). Σημαίνει ότι ο ταξινομητής έχει πολύ μεγάλο αριθμό παραμέτρων και έτσι έχει απομνημονεύσει τα δεδομένα, μειώνοντας την γενικευτική του ικανότητα. Τη στιγμή αυτή σταματάμε να αυξάνουμε τον αριθμό των παραμέτρων και θεωρούμε ότι έχει επιτευχθεί το βέλτιστο μοντέλο.

1.6.2.9 Δίκτυα πρόσθιας τροφοδότησης (feed forward)

Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη κατηγορία ΤΝΔ είναι το δίκτυο πρόσθιας τροφοδότησης (feed forward) το οποίο περιλαμβάνει ένα επίπεδο εισόδου, ένα ή περισσότερα κρυμμένα επίπεδα και ένα επίπεδο εξόδου. Τα δίκτυα αυτά εκπαιδεύονται με επίβλεψη με το γνωστό αλγόριθμο της αναδραστικής διάδοσης του σφάλματος (back-propagation error). Η διαδικασία εκπαίδευσης στον αλγόριθμο αυτό περιλαμβάνει υπολογισμούς που υλοποιούνται σε δύο περάσματα μέσω των επιπέδων (στρωμάτων) του δικτύου: ένα πέρασμα κατά την ευθεία φορά (από την είσοδο προς την έξοδο) και ένα κατά την αντίθετη φορά (από την έξοδο προς την είσοδο).

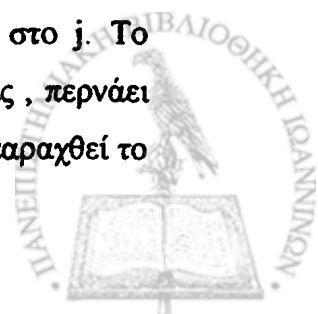
Ο κάθε νευρώνας έχει μία 'κατάσταση' ή 'επίπεδο δράσης' που καθορίζεται από την είσοδο που δέχεται από άλλους νευρώνες του δικτύου. Το σήμα που εμφανίζεται στην έξοδο ενός νευρώνα j υπολογίζεται ως εξής:

$$y_j(n) = \phi(u_j(n))$$

όπου $u_j(n)$ είναι το εσωτερικό σημείο ενεργοποίησης του νευρώνα j και καθορίζεται από την σχέση:

$$u_j(n) = \sum_{i=0}^p w_{ji}(n) y_i(n)$$

όπου $y_i(n)$ το σήμα εισόδου του νευρώνα j ή ισοδύναμα το σήμα εξόδου του νευρώνα i , $w_{ji}(n)$ είναι τα διανύσματα βάρους της μονάδας (βάρος σύνδεσης του νευρώνα i με το νευρώνα j) και p ο συνολικός αριθμός εισόδων που εφαρμόζονται στο j . Το ζυγισμένο άθροισμα $u_j(n)$ που ονομάζεται εισερχόμενο σήμα της μονάδας, περνάει έπειτα μέσω μιας μη γραμμικής λειτουργικής δράσης (μεταφοράς) για να παραχθεί το



εξερχόμενο σήμα, πχ. η κατάσταση της μονάδας (εκτιμώμενες τιμές, εάν βρίσκεται στο εξωτερικό στρώμα). Η πιο συνήθης μη γραμμική λειτουργία μεταφοράς πληροφοριών από το ένα στρώμα στο άλλο είναι η σιγμοειδής:

$$y = \phi(u) = \frac{1}{1 + e^{-u}}$$

όπου u είναι μία δεδομένη είσοδος σε μία μονάδα του νευρωνικού δικτύου και y είναι η αντίστοιχη έξοδος στην μονάδα αυτή. Είναι φανερό από την εξίσωση αυτή ότι η έξοδος έχει εύρος τιμών πάντοτε μεταξύ 0 και 1.

Εκπαιδévοντας το δίκτυο για να παραχθεί επιθυμητό δiάνυσμα εξόδου όταν παρουσιάζεται με μία είσοδο γίνονται συστηματικά αλλαγές μέχρις ότου το δίκτυο παράγει τις επιθυμητές εξόδους. Αυτό επαναλαμβάνεται κατά την διαδικασία της εκπαίδευσης. Ο αλγόριθμος υπολογίζει ένα σφάλμα μεταξύ των προβλεπόμενων και συγκεκριμένων τιμών στο εξωτερικό στρώμα. Αν το σφάλμα είναι μεγαλύτερο από την ανεκτικότητα, τότε ο αλγόριθμος ενεργοποιεί τα βάρη συνδέσεως κάνοντας back-propagating το σφάλμα με την μέθοδο gradient descent.

1.6.3 Γραμμική Συμμεταβολή

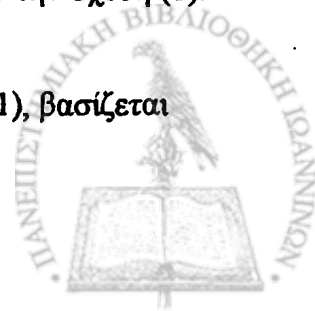
1.6.3.1 Απλή γραμμική συμμεταβολή

Η στατιστική μέθοδος που εξετάζει τη συμμεταβολή δύο μεταβλητών, εκ των οποίων η μία είναι η εξαρτημένη και η άλλη ανεξάρτητη, και η σχέση μεταξύ τους είναι γραμμική ονομάζεται απλή γραμμική συμμεταβολή¹⁴⁶. Ο σκοπός της απλής γραμμικής συμμεταβολής είναι να περιγράψει την σχέση μεταξύ των X και Y με μία σχέση που έχει την εξής μορφή:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \varepsilon_i \quad (1)$$

Όπου Y_i = η τιμή της εξαρτημένης μεταβλητής, X_i = η τιμή της ανεξάρτητης μεταβλητής, β_0 = το σημείο τομής στον άξονα της Y της γραμμικής σχέσης, β_1 = η κλίση της γραμμικής σχέσης και ε_i = το σφάλμα, δηλαδή η διαφορά μεταξύ της πραγματικής τιμής της Y και της τιμής πρόβλεψης που προκύπτει από την σχέση (1).

Η απλή γραμμική συμμεταβολή που περιγράφεται από την εξίσωση (1), βασίζεται στις τέσσερις υποθέσεις



1. Οι πειραματικές μετρήσεις της εξαρτημένης μεταβλητής είναι μεταξύ τους ανεξάρτητες.
2. Για κάθε συγκεκριμένη τιμή της X_i αντιστοιχούν πολλές πειραματικές τιμές της Y_i (στο κάθε δείγμα), που ανήκουν σε κανονική κατανομή.
3. Για n -δείγματα, που αντιστοιχούν n -διαφορετικές τιμές X_i οι τιμές των διαφορετικών n - Y_i ανήκουν σε n -κανονικές κατανομές της Y , με την ίδια μεταξύ τους παραλλακτικότητα σ^2 .
4. Ο μέσος όρος της κάθε (κανονικής) κατανομής της Y , ισούται με $E(Y_i) = \beta_0 + \beta_1 X_i$. Όλοι οι μέσοι βρίσκονται σε μία ευθεία γραμμή που αποτελεί την γραμμή συμμεταβολής του πληθυσμού.

Η ευθεία γραμμή της συμμεταβολής συνδέει τους μέσους όρους της μεταβλητής Y που αντιστοιχούν στις τιμές της X . Όπως με κάθε ευθεία γραμμή, έτσι και η γραμμή συμμεταβολής προσδιορίζεται από δύο παραμέτρους τις β_0 και β_1 , που ονομάζονται συντελεστές συμμεταβολής. Η β_0 δίνει το σημείο που τέμνει η γραμμή συμμεταβολής τον άξονα της Y . Για αυτό η ονομάζεται τεταγμένη στην αρχή μηδέν. Ο συντελεστής β_1 δίνει την κλίση της γραμμής συμμεταβολής. Είναι η μέση μεταβολή της εξαρτημένης μεταβλητής που αντιστοιχεί σε μεταβολή της X κατά μία μονάδα.

Εκτίμηση της Εξίσωσης συμμεταβολής

Έχει επικρατήσει στην διεθνή βιβλιογραφία, να συμβολίζονται με μικρούς ελληνικούς χαρακτήρες οι παράμετροι της γραμμικής σχέσης που αντιστοιχεί στο σύνολο του πληθυσμού, και με λατινικούς χαρακτήρες οι εκτιμήσεις τους από τα δεδομένα του δείγματος. Οι εκτιμήσεις των συντελεστών συμμεταβολής του πληθυσμού β_0 και β_1 από τα δεδομένα του είναι οι συντελεστές b_0 και b_1 , αντίστοιχα. Όταν οι εκτιμήσεις αυτές γίνουν γνωστές, θα είμαστε σε θέση να προβλέπουμε τις τιμές της Y με την εξίσωση συμμεταβολής:

$$\hat{Y} = b_0 + b_1 X_i$$

Δηλαδή, η \hat{Y} είναι η εκτίμηση της $E(Y)$. Έτσι, κατά αναλογία με την εξίσωση (1) που αναφέρεται στην γραμμή συμμεταβολής του πληθυσμού, οι αποκλίσεις μεταξύ των πραγματικών τιμών, Y και των τιμών \hat{Y} , τις συμβολίζουμε με e_i , δηλαδή:



$$e_i = Y_i - \hat{Y}_i$$

$$e_i = Y_i - (b_0 + b_1 X_i) \text{ για } i = 1, 2, \dots, n$$

Επομένως, αναζητούμε τις τιμές εκείνες των παραμέτρων, που θα ελαχιστοποιούν τις αποκλίσεις (σφάλματα) e_i . Επειδή τα σφάλματα έχουν και θετικό και αρνητικό πρόσημο, προσπαθούμε να ελαχιστοποιούμε τα τετράγωνά τους και μάλιστα το άθροισμα τετραγώνων τους. Έτσι, προκύπτει η ονομασία της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων. Το άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων για τα n ζεύγη μεταβλητών, ισούται με:

$$\sum (Y_i - \hat{Y}_i)^2 = \sum [Y_i - (b_0 + b_1 X_i)]^2$$

Με παραγωγή της παραπάνω εξίσωσης ως προς b_0 και b_1 , εξίσωση των παραγώγων τους με μηδέν και επίλυση των παραπάνω ως προς τις παραμέτρους αυτές, προκύπτει ότι

$$b_1 = \frac{n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \sum_{i=1}^n X_i \sum_{i=1}^n Y_i}{n \sum_{i=1}^n X_i^2 - (\sum_{i=1}^n X_i)^2}$$

$$b_0 = \frac{\sum_{i=1}^n Y_i}{n} - b_1 \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

Συντελεστής προσδιορισμού και συσχέτισης

Για να εκτιμήσουμε την συνολική διασπορά γύρω από τη γραμμή συµμεταβολής υπολογίζουμε το άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων των πειραματικών τιμών Y από τις αντίστοιχες τιμές \hat{Y} της συµμεταβολής. Το $\sum e^2 = \sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2$

ονομάζεται επίσης και **άθροισμα των τετραγώνων των σφαλμάτων** (sum of squared errors) και συµβολίζεται µε SSE.



Εκτός από τους συντελεστές συµµεταβολής, πρέπει να γνωρίζουμε και τη διακύµανση του σφάλµατος ε , δηλαδή την σ^2_ε . Η διακύµανση του σφάλµατος είναι η παράµετρος που καθορίζει τον βαθµό της εξάρτησης της Y από τη X . Η εκτίµησή της θα βασιστεί στο άθροισµα των τετραγώνων των σφαλµάτων γύρω από τη γραµµή συµµεταβολής. Συµβολίζοντας την εκτίµηση του σ^2_ε µε s^2_ε , έχουµε:

$$s^2_\varepsilon = \sum (Y - \hat{Y})^2 / n - 2 = SSE / n - 2$$

όπου n είναι οι βαθµοί ελευθερίας.

Χάνουµε δύο βαθµούς ελευθερίας γιατί η εκτίµηση του s^2_ε βασίζεται στην εκτίµηση δύο παραµέτρων, των b_0 και b_1 .

Αν εξετάσουµε τη συνολική διασπορά της εξαρτηµένης µεταβλητής Y , θα δούµε ότι η διασπορά µιας µεταβλητής ορίζεται από το άθροισµα των τετραγώνων των αποκλίσεων των τιµών από το µέσο τους όρο, δηλαδή $\sum (Y - \bar{Y})^2$. Το άθροισµα αυτό ονοµάζεται **συνολικό άθροισµα τετραγώνων** (total sum of squares) και συµβολίζεται µε **TSS**. Εποµένως:

$$TSS = \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2$$

Το TSS αντιπροσωπεύει το µέρος της συνολικής διασποράς της Y , που δεν εξηγείται από την εξίσωση συµµεταβολής. Το υπόλοιπο, δηλαδή $TSS - SSE$ οφείλεται στην επίδραση της X . Δηλαδή, η συνολική διασπορά της Y χωρίζεται σε δύο µέρη: στην εξάρτησή της από τη µεταβλητή X και το τυχαίο σφάλµα της µέτρησης της Y . Το

$$\sum (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2$$

άθροισµα αποτελεί µέρος της διασποράς της Y που οφείλεται στην εξίσωση συµµεταβολής. Ονοµάζεται **άθροισµα των τετραγώνων των τιµών της συµµεταβολής** (sum of squared regression) και συµβολίζεται µε **SSR**. Δηλαδή:

$$SSR = \sum_{i=1}^n (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2$$

Εποµένως ισχύει η σχέση:

$$TSS = SSR + SSE$$



Το ποσοστό της συνολικής διασποράς της Y που εξηγείται από την εξίσωση συµµεταβολής, ονοµάζεται **συντελεστής προσδιορισµού** και συµβολίζεται µε R^2 .

Έτσι έχουµε:

$$R^2 = SSR/TSS = \sum (\hat{Y} - \bar{Y})^2 / \sum (Y - \bar{Y})^2$$

$$R^2 = 1 - SSE/TSS = \frac{1 - (\sum Y^2 - b_0 \sum Y - b_1 \sum XY)}{[\sum Y^2 - (\sum Y)^2/n]}$$

Ο συντελεστής προσδιορισµού R^2 ισούται µε το τετράγωνο του **συντελεστή συσχέτισης** r^2 . Δηλαδή: $R^2 = r^2$

Έλεγχος Στατιστικής Σηµαντικότητας του Συντελεστή Προσδιορισµού

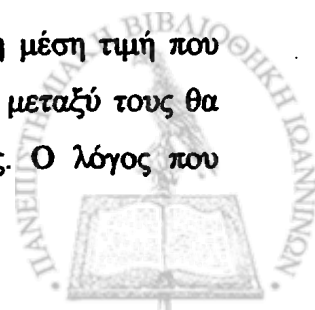
Ο έλεγχος της στατιστικής σηµαντικότητας του συντελεστή προσδιορισµού βασίζεται στη σχέση που δίνει τις δύο συνεισφορές στη συνολική διασπορά της Y , δηλαδή $TSS = SSR + SSE$. Στην πραγµατικότητα θα ελεγχθεί αν αυτό που µετρά ο R^2 , εάν το ποσοστό των µεταβολών της Y που οφείλεται στις επιδράσεις της X , και ως εκ τούτου εξηγείται από την εξίσωση συµµεταβολής, είναι διάφορο του µηδενός. Έτσι, η µηδενική υπόθεση (H_0) και η εναλλακτική υπόθεση (H_1) διατυπώνονται ως εξής:

Μηδενική υπόθεση (H_0): Η εξίσωση συµµεταβολής δεν εξηγεί καθόλου τις µεταβολές της Y (το ποσοστό της εξαρτηµένης διασποράς της Y είναι µηδέν).

Εναλλακτική υπόθεση (H_1): Η εξίσωση συµµεταβολής εξηγεί ένα µέρος των µεταβολών της Y (το ποσοστό της εξαρτηµένης διασποράς της Y είναι σηµαντικά µεγαλύτερο από το µηδέν).

Εποµένως για να συγκρίνουµε τις δύο συνεισφορές στην TSS (ολικό άθροισµα τετραγώνων), την SSR (άθροισµα τετραγώνων λόγω συµµεταβολής) και την SSE (άθροισµα τετραγώνων τυχαίου σφάλματος). Εάν η πρώτη είναι µεγαλύτερη της δεύτερης, συνεπάγεται ότι η επίδραση της εξίσωσης συµµεταβολής είναι σηµαντική. Εάν συµβεί το αντίθετο, συνεπάγεται ότι το ποσοστό της TSS που περιγράφεται από την εξίσωση είναι αµελητέο.

Τα SSR και SSE είναι αθροίσµατα τετραγώνων αποκλίσεων από τη µέση τιµή που βασίζονται σε διαφορετικό αριθµό βαθµών ελευθερίας. Η σύγκριση µεταξύ τους θα γίνει, αφού διαιρεθούν µε τους αντίστοιχους βαθµούς ελευθερίας. Ο λόγος που



προκύπτει μετά τη διαίρεση ονομάζεται μέσα τετράγωνα (mean squares, MS) και η δοκιμή F μας πληροφορεί εάν ισχύει η υπόθεση H_1 με 95% βεβαιότητα.

Ο πίνακας που ακολουθεί δείχνει όλη τη διαδικασία της δοκιμής F που ονομάζεται επίσης και έλεγχος ανάλυσης διακύμανσης.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Έλεγχος της Στατιστικής Σημαντικότητας της Εξίσωσης συµµεταβολής

Αιτία Μεταβολής	Αθροίσματα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσα τετράγωνα	Λόγος $F_{1,n-2}$
Συµµεταβολή	SSR	1	SSR/1	$[SSR/1]/[SSE/(n-2)]$
Υπολειµατική	SSE	n-2	SSE/n-2	
σύνολο	TSS	n-1		

Εάν η πειραµατική τιμή $F_{1,n-2}$ είναι µεγαλύτερη της θεωρητικής τιµής $F_{1,n-2,\alpha}$ (όπου $\alpha =$ επίπεδο αβεβαιότητας), απορρίπτεται η υπόθεση H_0 και αντίστροφα. Ο λόγος $SSE/n-2$ ονοµάζεται και µέσο τετραγωνικό σφάλµα και συµβολίζεται µε MSE.

Έλεγχος στατιστικής σηµαντικότητας του συντελεστή συµµεταβολής

Ο συντελεστής συµµεταβολής είναι εκείνος που επωµίζεται όλη την 'ευθύνη' της περιγραφής της σχέσης εξάρτησης της Y από τη X. Συνεπώς, όλη η επιτυχία της ανάλυσης συµµεταβολής εξαρτάται από την επιτυχή εκτίµηση του συντελεστή β_1 . Επιτυχία σηµαίνει να είναι η εκτίµηση αµερόληπτη και αποτελεσµατική, δηλαδή να έχει µικρό δειγµατοληπτικό σφάλµα και µεγάλη πιθανότητα να βρίσκεται κοντά στην πραγµατική τιμή του πληθυσµού. Εποµένως, τόσο ο έλεγχος της σηµαντικότητας του β_1 , όσο και η εκτίµηση του διαστήµατος εµπιστοσύνης, είναι απαραίτητες δοκιµές πριν χρησιµοποιήσουµε την εξίσωση συµµεταβολής.

Το τυπικό σφάλµα της κατανοµής δειγµατοληψίας του συντελεστή β_1 συµβολίζεται µε s_{b_1} και δίνεται από την σχέση:



$$\sigma_{b_1} = \frac{\sigma_e}{\sqrt{\sum (X - \bar{X})^2}}$$

όπου σ_e είναι το τυπικό σφάλμα πληθυσμού της εξίσωσης συµµεταβολής. Όµως το σ_e δεν είναι γνωστό και εποµένως θα χρησιµοποιήσουµε την εκτίµησή του από τα δεδοµένα του δείγµατος, το s_e . Έτσι, η εκτίµηση του τυπικού σφάλµατος σ_{b_1} συµβολίζεται µε s_{b_1} και είναι ίσο µε:

$$s_{b_1} = \frac{s_e}{\sqrt{\sum (X - \bar{X})^2}}$$

Το s_{b_1} ονοµάζεται και τυπικό σφάλµα δείγµατος του συντελεστή συµµεταβολής β_1 . Η δοκιµή της σηµαντικότητας του β_1 και η εκτίµηση του διαστήµατος εµπιστοσύνης βασίζονται στο s_{b_1} . Έτσι, η µηδενική υπόθεση (H_0) και η εναλλακτική υπόθεση (H_1) διατυπώνονται ως εξής:

Μηδενική υπόθεση (H_0) $\beta_1 = \beta_1^*$. Ο συντελεστής συµµεταβολής του πληθυσµού ισούται µε β_1^*

Εναλλακτική υπόθεση (H_1) $\beta_1 \neq \beta_1^*$. Ο συντελεστής συµµεταβολής του πληθυσµού είναι διάφορος του β_1^*

Ο έλεγχος γίνεται µε το γνωστό κριτήριο t και $n-2$ βαθµούς ελευθερίας. Δηλαδή:

$$t_{n-2} = |b_1 - \beta_1^*| / s_{b_1}$$

Εάν η τιµή $|t_{n-2}|$ είναι µεγαλύτερη της θεωρητικής τιµής $|t_{n-2, \alpha/2}|$, απορρίπτεται η υπόθεση µηδέν και αντίστροφα. Το κριτήριο είναι δικατάληκτο και εποµένως για επίπεδο σηµαντικότητας α , η θεωρητική τιµή αντιστοιχεί στο κάτω ή άνω $\alpha/2$ της αντίστοιχης κατανοµής t µε $n-2$ βαθµούς ελευθερίας.

Για επίπεδο σηµαντικότητας α , το διάστηµα εµπιστοσύνης ισούται µε

$$b_1 - s_{b_1} \cdot t_{n-2, \alpha/2} < \beta_1 < b_1 + s_{b_1} \cdot t_{n-2, \alpha/2}$$

1.6.3.2 Πολλαπλή γραµµική συµµεταβολή

Η µέθοδος της πολλαπλής συµµεταβολής αποτελεί επέκταση της απλής γραµµικής συµµεταβολής για περισσότερες ανεξάρτητες µεταβλητές.



Ο σκοπός της πολλαπλής συμμεταβολής είναι να περιγράψει τη σχέση μεταξύ της εξαρτημένης μεταβλητής Y και των ανεξάρτητων μεταβλητών X_1, X_2, \dots, X_k που έχει την εξής μορφή

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon$$

Η εκτίμηση των παραμέτρων δηλαδή των συντελεστών της γραμμικής συμμεταβολής που ονομάζονται συντελεστές μερικής συμμεταβολής $b_0, b_1, b_2, \dots, b_k$ γίνεται με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Γενικά, ισχύουν τα ίδια ακριβώς πράγματα όπως στην περίπτωση της απλής συμμεταβολής. Ο συντελεστής R^2 ονομάζεται συντελεστής πολλαπλού προσδιορισμού.

Δοκιμές Στατιστικής Σημαντικότητας

- Η δοκιμή της στατιστικής σημαντικότητας της εξίσωσης συμμεταβολής ταυτίζεται με την δοκιμή της στατιστικής σημαντικότητας του συντελεστή πολλαπλού προσδιορισμού R^2 . Έτσι, η μηδενική υπόθεση (H_0) και η εναλλακτική υπόθεση (H_1) διατυπώνονται ως εξής:

Μηδενική υπόθεση (H_0): Η εξίσωση συμμεταβολής δεν εξηγεί καθόλου τις μεταβολές της Y (το ποσοστό της εξαρτημένης διασποράς της Y είναι μηδέν) και επομένως $\beta_0 = \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_k = 0$.

Εναλλακτική υπόθεση (H_1): Η εξίσωση συμμεταβολής εξηγεί ένα μέρος των μεταβολών της Y (το ποσοστό της εξαρτημένης διασποράς της Y είναι μεγαλύτερο από το μηδέν), και τουλάχιστον ένας συντελεστής $\beta_i \neq 0$.

Επομένως, συγκρίνοντας τις δύο συνιστώσες της TSS, την εξηγημένη (SSR) δηλ. το άθροισμα των τετραγώνων λόγω συμμεταβολής και την ανεξήγητη (SSE) δηλ. το άθροισμα των υπολειμματικών τετραγώνων, εάν βρούμε ότι η πρώτη είναι σημαντικά μεγαλύτερη της δεύτερης, σημαίνει ότι η επίδραση της εξίσωσης συμμεταβολής είναι σημαντική. Εάν είναι μικρότερη όμως, αυτό σημαίνει ότι το ποσοστό της που περιγράφεται από την εξίσωση συμμεταβολής είναι αμελητέο.

Τα SSR και SSE είναι αθροίσματα τετραγώνων αποκλίσεων που βασίζονται σε διαφορετικό αριθμό βαθμών ελευθερίας. Η σύγκριση μεταξύ τους θα γίνει αφού διαιρεθούν με τους αντίστοιχους βαθμούς ελευθερίας. Οι λόγοι που προκύπτουν



ονομάζονται μέσα τετράγωνα (mean squares, MS) και η δοκιμή μεταξύ τους βασίζεται στην κατανομή F.

Ο πίνακας που ακολουθεί δείχνει όλη την διαδικασία του ελέγχου (ονομάζεται επίσης και έλεγχος ανάλυσης διακύμανσης).

Εάν η πειραματική τιμή $F_{k,n-k-1}$ είναι μεγαλύτερη της θεωρητικής τιμής $F_{(k,n-k-1),\alpha}$ (όπου α = επίπεδο αξιοπιστίας) απορρίπτεται η υπόθεση μηδέν και αντίστροφα. Ο λόγος $SSE/n-k-1$ ονομάζεται και μέσο τετραγωνικό σφάλμα (mean square error) και συμβολίζεται με MSE. Το μέσο τετραγωνικό σφάλμα είναι το τετράγωνο του τυπικού σφάλματος εκτίμησης και ισούται με s_e^2 .

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Έλεγχος της Στατιστικής Σημαντικότητας της Εξίσωσης συµµεταβολής

Αιτία Μεταβολής	Αθροίσματα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσα τετράγωνα	Λόγος $F_{k,n-k-1}$
Συµµεταβολή	SSR	k	SSR/k	$[SSR/k]/[SSE/(n-k-1)]$
Υπολειμματική	SSE	n-k-1	SSE/n-k-1	
σύνολο	TSS	n-1		

όπου k είναι ο αριθµός των ανεξάρτητων µεταβλητών.

Εάν ο πρώτος έλεγχος της στατιστικής σηµαντικότητας του συντελεστή πολλαπλής συσχέτισης δείξει ότι η εξίσωση συµµεταβολής, στο σύνολό της, εξηγεί ένα µέρος των µεταβολών της µεταβλητής Y, το επόµενο βήµα είναι να ελέγξουµε την σηµαντικότητα των συντελεστών µερικής συµµεταβολής b_i , $i = 1, 2, \dots, k$. Όπως συµβαίνει µε όλες τις παραµέτρους που η εκτίµησή τους βασίζεται σε δείγµα παρατηρήσεων, έτσι και οι συντελεστές b_i υπόκειται σε σφάλµατα της δειγµατοληψίας. Αυτό σηµαίνει ότι πρέπει να γνωρίζουµε όχι µόνο αν οι b_i είναι διάφοροι του µηδενός, αλλά και σε ποιο διάστηµα αξιοπιστίας βρίσκονται οι τιµές των συντελεστών µερικής συµµεταβολής του πληθυσµού.

Το τυπικό σφάλµα της κατανοµής δειγµατοληψίας του συντελεστή b_i συµβολίζεται µε s_{b_i} και έτσι, η µηδενική υπόθεση (H_0) και η εναλλακτική υπόθεση (H_1) διατυπώνονται ως εξής:



Μηδενική υπόθεση (H_0): $\beta_i = \beta_i^*$

Ο συντελεστής μεταβολής του πληθυσμού ισούται με β_i^* .

Εναλλακτική υπόθεση (H_1): $\beta_i \neq \beta_i^*$

Ο συντελεστής μεταβολής του πληθυσμού είναι διάφορος του β_i^* .

Ο έλεγχος γίνεται με τη γνωστή δοκιμή σημαντικότητας t και $n-k-1$ βαθμούς ελευθερίας, δηλαδή:

$$t_{n-k-1} = |b_i - \beta_i^*| / s_{b_i}$$

Εάν η πειραματική τιμή t_{n-k-1} είναι μεγαλύτερη της θεωρητικής τιμής $t_{n-k-1, \alpha/2}$, απορρίπτεται η υπόθεση H_0 και αντίστροφα. Το κριτήριο είναι δικατάληκτο και επομένως σε επίπεδο αβεβαιότητας α , η θεωρητική τιμή αντιστοιχεί στο κάτω ή άνω $\alpha/2$ της αντίστοιχης κατανομής t με $n-k-1$ βαθμούς ελευθερίας.

Για επίπεδο αβεβαιότητας α , το διάστημα αξιοπιστίας του συντελεστή μεταβολής ισούται με:

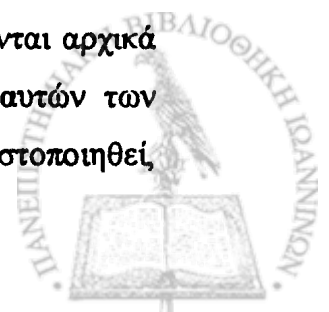
$$b_i - s_{b_i} \cdot t_{n-k-1, \alpha/2} < \beta_i < b_i + s_{b_i} \cdot t_{n-k-1, \alpha/2}$$

1.6.4 Ανάλυση σε συστάδες

Η ανάλυση σε συστάδες ή δέσμες, όπως έχει ειπωθεί και σε προηγούμενη παράγραφο, ανήκει στις τεχνικές της μάθησης χωρίς επίβλεψη και διερευνά κατά πόσο, με βάση συγκεκριμένες μεταβλητές, οι παρατηρήσεις είναι όμοιες μεταξύ τους, κατά πόσο συνιστούν δηλαδή ομοιογενείς ομάδες, τόσο ώστε να θεωρηθεί ότι καθεμία από αυτές αποτελεί μέλος μίας και μοναδικής συστάδας.

Η ανάλυση σε συστάδες μπορεί να λειτουργήσει όχι μόνο ως προς την κατεύθυνση ομαδοποίησης παρατηρήσεων (που είναι και η συνήθης περίπτωση) αλλά και προς την κατεύθυνση ομαδοποίησης μεταβλητών¹⁴⁷. Ως προς τη διαδικασία, ενώ για την ανάλυση σε συστάδες παρατηρήσεων χρειάζεται τουλάχιστον μία μεταβλητή, στην ανάλυση σε συστάδες μεταβλητών χρειάζονται τουλάχιστον τρεις μεταβλητές.

Η ανάλυση σε συστάδες μπορεί να γίνει είτε με την τεχνική της ιεραρχικής ανάλυσης σε συστάδες είτε με την τεχνική της ανάλυσης σε συστάδες K μέσων. Η δεύτερη συνιστάται στην περίπτωση μεγάλου αριθμού παρατηρήσεων και απαντά κυρίως στο ποια αντικείμενα ανήκουν σε καθορισμένο αριθμό συστάδων. Σχηματίζονται αρχικά K τυχαίες συστάδες, και μετά τα αντικείμενα μετακινούνται μεταξύ αυτών των συστάδων μέχρις ότου η συμμεταβολή εντός της ίδιας συστάδας να ελαχιστοποιηθεί,



ενώ η συμμεταβολή μεταξύ δύο διαφορετικών συστάδων να μεγιστοποιηθεί. Παρακάτω, περιγράφεται η ιεραρχική ανάλυση σε συστάδες, καθώς αυτή χρησιμοποιείται στην παρούσα μελέτη.

1.6.4.1 Ιεραρχική ανάλυση σε συστάδες

A. Κριτήρια ταξινόμησης των παρατηρήσεων

A1. Επιλογή των μεταβλητών

Το είδος του κριτηρίου ταξινόμησης, συνεπώς και η ομαδοποίηση των παρατηρήσεων, εξαρτώνται ουσιαστικά από τις μεταβλητές που θα χρησιμοποιηθούν. Έτσι, πρέπει να επιλεγούν επιτυχώς οι μεταβλητές οι οποίες και θα καθορίσουν την αξία της ομαδοποίησης των παρατηρήσεων ως προς το συγκεκριμένο πρόβλημα, πολύ περισσότερο μάλιστα γιατί η αρχική επιλογή των μεταβλητών είναι αυτή που καθορίζει τα χαρακτηριστικά για την αναγνώριση υποομάδων.

A2. Μέτρηση της απόστασης ή ομοιότητας των τιμών

Ο προσδιορισμός του τρόπου μέτρησης της απόστασης μεταξύ των τιμών των παρατηρήσεων, καθώς και τα κατάλληλα κριτήρια ομοιότητας με βάση τα οποία θα γίνει ο συνδυασμός των παρατηρήσεων σε συστάδες είναι αναγκαίος, γιατί η έννοια του μέτρου της απόστασης και της ομοιότητας είναι ουσιαστικής σημασίας, αφού οι παρατηρήσεις ομαδοποιούνται με βάση την προσεγγισιμότητά τους.

Τα μέτρα απόστασης d_{ij} μεταξύ δύο αντικειμένων i και j διαφοροποιούνται ανάλογα με το είδος των μεταβλητών που χρησιμοποιούνται. Έτσι, για τις συνεχείς μεταβλητές χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα μέτρα:

Η ευκλείδεια απόσταση σύμφωνα με την σχέση

$$d_{ij} = \sqrt{\sum_{k=1}^{NV} (x_{ik} - x_{jk})^2}$$

όπου NV είναι ο αριθμός των μεταβλητών (ίσος με n σε n -διάστατο χώρο)

Άλλο μέτρο απόστασης είναι αυτό που βασίζεται στις απόλυτες τιμές των διαφορών των τιμών των παρατηρήσεων, η απόσταση Manhattan γνωστή και ως city-block, που ισούται με το άθροισμα των απόλυτων διαφορών των τιμών για το σύνολο των μεταβλητών. Δίνεται από την σχέση:



$$d_{ij} = \sum_{k=1}^{NV} |x_{ik} - x_{jk}|$$

A3. Τυποποίηση των τιμών

Εάν οι μεταβλητές έχουν διάφορες κλίμακες μέτρησης (και συνήθως αυτό συμβαίνει) και δεν τυποποιηθούν από την αρχή ή επανακλιμακωθούν, οποιοδήποτε μέτρο απόστασης θα αντανακλά πρωταρχικά τη συμβολή εκείνων των μεταβλητών που θα έχουν μετρηθεί με μεγάλες μονάδες μέτρησης.

Δύο ομάδες μεθόδων μετασχηματισμού διακρίνονται, μία της τυποποίησης των αρχικών τιμών πριν από τον υπολογισμό των μέτρων απόστασης ή ομοιότητας και μία του μετασχηματισμού των μετρήσεων που προκύπτουν μετά τη χρησιμοποίηση των μέτρων απόστασης ή ομοιότητας.

i. Τυποποίηση αρχικών τιμών παρατηρήσεων

Γίνεται με την χρησιμοποίηση πολλών μεθόδων, η πιο συνηθισμένη είναι αυτή της μετατροπής των αρχικών μονάδων σε τυπικούς βαθμούς z , με αριθμητικό μέσο όρο το 0 και τυπική απόκλιση το 1, σύμφωνα με την σχέση:

$$z = \frac{X_i - \bar{X}}{s}$$

(όπου \bar{X}_i είναι ο αριθμητικός μέσος όρος των τιμών των παρατηρήσεων της συγκεκριμένης μεταβλητής και s η τυπική απόκλισή τους).

Σπανιότερα χρησιμοποιούνται και άλλα μέτρα μετασχηματισμού των αρχικών τιμών, όπως η τυποποίηση σε τιμές μοναδιαίου μέτρου ως προς το εύρος διασποράς σε τιμές (-1, +1), η τυποποίηση ως προς το διάστημα (0,1) με την διαίρεση της καθεμίας τιμής με το εύρος αφού αφαιρεθεί προηγουμένως αφαιρεθεί η ελάχιστη τιμή των παρατηρήσεων.

ii. Μετασχηματισμός μετρήσεων

Αφορά τον μετασχηματισμό των μετρήσεων που προκύπτουν μετά την χρησιμοποίηση του μέτρου απόστασης. Η ομάδα αυτή των μέτρων περιλαμβάνει:



Τον μετασχηματισμό των αποστάσεων σε απόλυτες τιμές. Χρησιμοποιείται όταν το πρόσημο δηλώνει την διεύθυνση της σχέσης, ωστόσο μόνο το μέγεθος της σχέσης ενδιαφέρει.

Τον μετασχηματισμό με την αλλαγή του προσήμου που μετασχηματίζει τιμές ομοιότητας σε τιμές ανομοιότητας και αντιστρόφως. Χρησιμοποιείται για την αντιστροφή της διάταξης των τιμών των αποστάσεων.

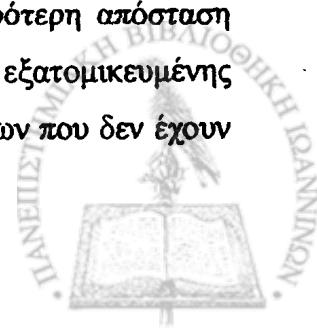
Τον μετασχηματισμό με επανακλιμάκωση στο εύρος 0-1, κατά το οποίο τυποποιούνται οι αποστάσεις με την αφαίρεση, κατά πρώτον της μικρότερης τιμής και με την διαίρεση στη συνέχεια δια του εύρους.

B. Σχηματισμός των συστάδων

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι συνδυασμού των παρατηρήσεων σε συστάδες. Η συνήθης χρησιμοποιούμενη είναι η ιεραρχική ανάλυση σε συστάδες η οποία χρησιμοποιεί μία από τις ακόλουθες τεχνικές, α) την συσσωρευτική ιεραρχική ανάλυση σε συστάδες ή β) την επιμεριστική ιεραρχική ανάλυση σε συστάδες. Με την πρώτη, οι συστάδες σχηματίζονται με την ομαδοποίηση των παρατηρήσεων σε όλο και μεγαλύτερες συστάδες, μέχρις ότου όλες οι παρατηρήσεις καταστούν μέλη μίας και μόνο συστάδας. Η δεύτερη ξεκινά με όλες τις παρατηρήσεις να είναι ομαδοποιημένες και επιμερίζει στην συνέχεια αυτές σε τόσες συστάδες όσες και οι παρατηρήσεις.

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι που καθορίζουν ποιες παρατηρήσεις ή συστάδες πρέπει να συνδυαστούν σε κάθε στάδιο, που διαφέρουν ως προς το βαθμό κατά τον οποίο εκτιμούν τις αποστάσεις μεταξύ των συστάδων στα διαδοχικά στάδια. Εφόσον μάλιστα η συνένωση συστάδων σε κάθε στάδιο εξαρτάται από το μέτρο της χρησιμοποιούμενης απόστασης, διαφορετικά μέτρα απόστασης μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικές λύσεις συστάδων για την ίδια ανάλυση. Όλες οι μέθοδοι βασίζονται σε μήτρα είτε αποστάσεων είτε ομοιοτήτων μεταξύ ζευγών παρατηρήσεων..

Η απλούστερη μέθοδος είναι η μέθοδος του απλού δεσμού γνωστή και ως μέθοδος του 'εγγύτερου γείτονα'. Σε αυτήν, συνδυάζονται οι δύο πρώτες παρατηρήσεις που έχουν την μικρότερη απόσταση (ή την μεγαλύτερη ομοιότητα) μεταξύ τους, όπως φαίνεται και στο σχήμα 1.14. Υπολογίζεται στην συνέχεια η μικρότερη απόσταση μεταξύ μιας παρατήρησης στην νέα συστάδα και μίας άλλης εξατομικευμένης παρατήρησης, ενώ διατηρούνται οι αποστάσεις μεταξύ παρατηρήσεων που δεν έχουν



συνδυαστεί. Σε κάθε στάδιο η απόσταση μεταξύ δύο συστάδων θεωρείται η απόσταση μεταξύ των εγγύτερων σημείων τους.

Άλλη συνήθης μέθοδος σχηματισμού συστάδων είναι η μέθοδος πλήρους δεσμού ή αλλιώς μέθοδος του 'απώτερου γείτονα'. Στην μέθοδο αυτή, ως απόσταση μεταξύ δύο συστάδων υπολογίζεται αυτή μεταξύ των απώτερων σημείων τους, όπως φαίνεται και στο σχήμα 1.14.

Επίσης, η μέθοδος του μέσου δεσμού μεταξύ των ομάδων, συχνά καλούμενη και μέθοδος μη σταθμισμένων ζευγών των ομάδων γίνεται με την χρησιμοποίηση αριθμητικών μέσων. Η μέθοδος αυτή ορίζει την απόσταση μεταξύ δύο συστάδων ως την μέση τιμή των αποστάσεων μεταξύ όλων των ζευγών των παρατηρήσεων, όπου ένα μέλος ζεύγους προέρχεται από καθεμιά από τις συστάδες. Η διαφορά της μεθόδου αυτής από τις δύο προηγούμενες είναι ότι χρησιμοποιεί όλες τις παρατηρήσεις και όχι απλά την εγγύτερη ή την απώτερη, για αυτό και προτιμάται συχνότερα.

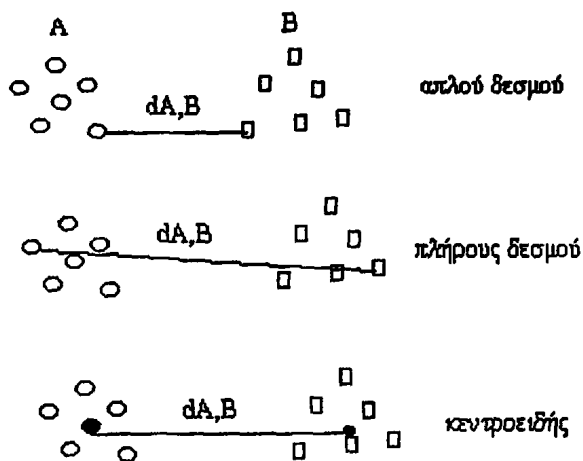
- Παραλλαγή της μεθόδου αυτής είναι και η μέθοδος του μέσου δεσμού εντός των ομάδων, η οποία συνδυάζει τις συστάδες έτσι που η μέση απόσταση μεταξύ όλων των παρατηρήσεων στην προκύπτουσα συστάδα είναι όσο το δυνατόν μικρότερη.

Άλλη μέθοδος συχνά χρησιμοποιούμενη είναι και η μέθοδος Ward. Σε αυτή υπολογίζονται οι αριθμητικοί μέσοι όλων των μεταβλητών για καθεμία συστάδα και στην συνέχεια το τετράγωνο της ευκλείδειας απόστασης καθεμιάς παρατήρησης προς τους μέσους της συστάδας, ενώ τέλος οι αποστάσεις αυτές αθροίζονται για όλες τις παρατηρήσεις.

Η κεντροειδής μέθοδος που είναι η πιο σχολαστική αλλά και η πιο αργή υπολογιστικά υπολογίζει την απόσταση μεταξύ δύο συστάδων ως εκείνη μεταξύ των αριθμητικών μέσων τους στο σύνολο των μεταβλητών, όπως φαίνεται και στο σχήμα 1.14.

Αντίθετα με την κεντροειδή μέθοδο όπου το κεντροειδές της συστάδας που θα προκύψει από την συγχώνευση συστάδων είναι ο σταθμισμένος συνδυασμός των κεντροειδών των δύο ξεχωριστών συστάδων, στην μέθοδο του διάμεσου όρου οι δύο συστάδες που συνδυάζονται σταθμίζονται ισόποσα στον υπολογισμό του κεντροειδούς, ανεξαρτήτως του αριθμού των παρατηρήσεων σε κάθε μία συστάδα. Πάντως, τόσο για την κεντροειδή μέθοδο όσο και για την μέθοδο του διάμεσου όρου επιβάλλεται να χρησιμοποιείται η μέθοδος των τετραγώνων της ευκλείδειας απόστασης.





ΣΧΗΜΑ 1.14: Μέθοδοι σχηματισμού συστάδων

1.6.4.2 Διαδικασία της Ανάλυσης σε συστάδες

Η διαδικασία της Ανάλυσης σε συστάδες ακολουθεί μία σειρά σταδίων, όπως τα παρακάτω:

- A) Υπολογισμός της μήτρας των συντελεστών του χρησιμοποιούμενου μέτρου των αποστάσεων (συνήθως των συντελεστών των τετραγώνων των ευκλείδων αποστάσεων) ή των ομοιοτήτων, για όλα τα δυνατά ζεύγη των παρατηρήσεων ύστερα από την τυποποίησή τους (συνήθως σε τιμές z).
- B) Καθορισμός της μεθόδου ως προς την απόσταση με βάση την οποία θα συνδυαστούν παρατηρήσεις ή συστάδες.
- Γ) Παρουσίαση των συστάδων κατά στάδια σε διάγραμμα κάθετων αξόνων και ερμηνεία των ενδείξεων. Στην περίπτωση μεγάλου αριθμού παρατηρήσεων, η χρησιμοποίηση διαγράμματος κάθετων σχηματισμών μπορεί να μην καλύπτει το χώρο για την αποτύπωση (όρια της σελίδας). Στην περίπτωση αυτή, η αποτύπωση γίνεται σε διάγραμμα οριζόντιων σχηματισμών.
- Δ) Παρουσίαση συνοπτικών αποτελεσμάτων της ανάλυσης σε συσσωρευτικό σχέδιο και ερμηνεία τους. Το σχέδιο αυτό περιλαμβάνει τον αριθμό των συνδυασμένων παρατηρήσεων ή συστάδων σε κάθε στάδιο, καθώς και τα τετράγωνα των ευκλείδων αποστάσεων για κάθε ζεύγος παρατηρήσεων (με το όνομα συντελεστής), οι τιμές των

οποίων δηλώνουν την ομοιότητα ή την ανομοιότητα των παρατηρήσεων, δηλαδή τον βαθμό ομοιογένειας των συστάδων.

Ε) Παρουσίαση της σειράς των σταδίων σχηματισμού των συστάδων με την χρησιμοποίηση του δενδρογράμματος. Το δενδρογράμμα εμφανίζει τις συνδυασμένες συστάδες και τις τιμές των συντελεστών σε κάθε στάδιο. Δεν αποτυπώνει τις πραγματικές αποστάσεις, αλλά επανακλιμακώνει αυτές στο διάστημα των αριθμών 0-25 και συνεπώς εμφανίζει το λόγο των αποστάσεων μεταξύ των διαδοχικών σταδίων. Το δενδρογράμμα δείχνει όχι μόνο ποιες συστάδες συνδυάζονται, αλλά και την απόσταση κατά την οποία συνδυάζονται.

Στ) Μερικές φορές είναι χρήσιμη η παράθεση πληροφοριών υπό μορφή πίνακα που περιλαμβάνει την συμμετοχή των παρατηρήσεων στις συστάδες και τον αριθμό των συστάδων σε διάφορα στάδια.

Ζ) Η ταξινόμηση των παρατηρήσεων σε ομάδες (συστάδες) είναι το τελικό στάδιο - κατά το οποίο κάθε παρατήρηση ταξινομείται, με βάση τις δεδομένες μεταβλητές σε συγκεκριμένη συστάδα. Η ταξινόμηση των παρατηρήσεων μπορεί να γίνει είτε σε προσδιορισμένο αριθμό συστάδων (απλής λύσης) είτε σε συστάδες εύρους λύσεων.

1.6.4.3 Εφαρμογές της Ανάλυσης σε συστάδες στη Χημεία

Στη Χημεία, η Ανάλυση σε συστάδες έχει χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση των διαφόρων τύπων ιζημάτων ¹⁴⁸, για τον χαρακτηρισμό της ρύπανσης των υπόγειων νερών σαν αποτέλεσμα των αστικών επιδράσεων ¹⁴⁹, για τη μελέτη της ποιότητας των επιφανειακών νερών ¹⁵⁰, για τη διάκριση μεταξύ δειγμάτων χώματος από διαφορετικές περιοχές ¹⁵¹.

Ένα ευρύ φάσμα μεθόδων Ανάλυσης σε συστάδες που εφαρμόσθηκαν σε χημικά προβλήματα περιγράφονται από τον Massart ¹⁵².



ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Λαμβάνοντας υπόψη την παρατεθείσα βιβλιογραφία, φαίνεται πως έχουν γίνει κάποιες προσπάθειες χαρακτηρισμού των νερών και απόνερων με βάση το φάσμα απορρόφησης UV-ακτινοβολίας των συστατικών του. Οι μελέτες έδειξαν πως μπορεί να γίνει εκτίμηση της καταλληλότητας του νερού ή απόνερου για διάφορες χρήσεις όταν το UV φάσμα απορρόφησης του άγνωστου απόνερου συγκριθεί με αυτά πρότυπων απόνερων που έχουν συγκεκριμένες παραμέτρους ποιότητας (COD, BOD, TN-Kjeldahl, TP, TSS, νιτρικά, νιτρώδη, αμμώνιο). Επίσης, έχουν γίνει μελέτες που συνδυάζουν τεχνικές κλασμάτωσης των συστατικών των απόνερων και εξέταση των φασμάτων απορρόφησης UV-ακτινοβολίας των απονέρων και των κλασμάτων αυτών. Ο στόχος των μελετών αυτών είναι να αντιστοιχίσουν τα φάσματα σε κατηγορίες ενώσεων που απαντώνται στα αστικά και βιομηχανικά απόνερα. Οι μελέτες αυτές βέβαια δίνουν πληροφορίες που έχουν τη σημασία τους, αλλά δεν μπορούν να κατηγοριοποιήσουν τα απόνερα με βάση τη χρήση στην οποία έχουν υποβληθεί και απέκτησαν την αντίστοιχη επιβάρυνση. Μια τέτοια πιστοποίηση θα ήταν πολύ χρήσιμη για την ομαλή λειτουργία των εγκαταστάσεων των βιολογικών καθαρισμών, την ταχεία πιστοποίηση της τοξικότητας των απόνερων, την επιλογή της κατάλληλης κατεργασίας για την ανακύκλωση, την οικονομική διαχείριση του νερού, την ασφαλή χρήση του κ.λ.π.

Στην παρούσα εργασία γίνεται προσπάθεια κατηγοριοποίησης των λυμάτων με χρήση χημειομετρικών τεχνικών κατηγοριοποίησης (μεθόδους καθοδηγούμενης μάθησης και χωρίς μάθηση) στα αρχικά φάσματά τους αλλά και σε αυτά των κλασμάτων αυτών που προκύπτουν μετά από κλασμάτωση με διάφορες τεχνικές διαχωρισμού.

Ο στόχος είναι να βρεθεί μια ταχεία μέθοδος αναγνώρισης της πηγής ρύπανσης του νερού μέσα από την μορφή του φάσματος απορρόφησης UV-ακτινοβολίας αυτού ή των κλασμάτων αυτού.



ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΠΙΤΕΥΞΗΣ ΤΟΥ ΣΤΟΧΟΥ

- Η κλασμάτωση του ρύπου των αστικών, νοσοκομειακών, βιομηχανικών λυμάτων καθώς και επιφανειακών ρυπασμένων νερών με διάφορες τεχνικές διαχωρισμού και η κατηγοριοποίηση των διαφόρων ειδών με χημειομετρικές τεχνικές με βάση το UV-φάσμα απορρόφησης αυτών και των κλασμάτων τους.
- Ταχεία μέθοδος διαχωρισμού και χρήση του χρωματογραφήματος για την αναγνώριση του είδους του απόνευρου.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν:

- Η υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (RP-HPLC),
- Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC),
- Η τεχνική διαχωρισμού με μεμβράνες διαπίδυσης (Dialysis) και
- Χημειομετρικές μέθοδοι. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τα Νευρωνικά Δίκτυα (Neural Networks) και την Ανάλυση σε συστάδες (Cluster Analysis).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΠΕΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα δείγματα που αναλύθηκαν, προέρχονται από τις εισόδους διαφόρων μονάδων βιολογικών καθαρισμών και φυλάσσονταν σε φιάλες από πολυαιθυλένιο. Πάντα, πριν από κάθε δειγματοληψία οι φιάλες εκπλύνονταν με απεσταγμένο ύδωρ. Οι διηθήσεις των δειγμάτων γινόταν αμέσως, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά, με την άφιξή τους στο εργαστήριο, ενώ για τις όποιες φορές που δεν γινόταν αμέσως οι αναλύσεις, τα δείγματα διατηρούνταν στους 4°C.

Τα δείγματα που ελήφθησαν, χαρακτηρίζονται περισσότερο σαν διαδοχικά και λαμβάνονταν υπό καθεστώς επικράτειας ροής, αλλά και επικράτειας χρόνου (πάντοτε κατά τις πρωινές ώρες, καθημερινές μέρες).

2.2 ΛΗΨΗ ΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΩΝ

Για τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης στην περιοχή του υπεριώδους (200-400 nm) χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο της εταιρίας SECOMAM συνδεδεμένο με PC.

Τα αρχικά δείγματα των υγρών αποβλήτων και των επιφανειακών νερών μετά τη συλλογή τους, προωθούνταν αμέσως για τη λήψη του UV φάσματός τους. Στις περισσότερες περιπτώσεις γινόταν αραιώση των δειγμάτων για να ληφθεί το φάσμα εντός κλίμακος (να μην έχουμε απορρόφηση πάνω από 2,5).



2.3 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η μέτρηση των κυριότερων παραμέτρων ποιότητας των δειγμάτων έγινε με τις συμβατικές μεθόδους, όπως περιγράφονται παρακάτω ¹¹:

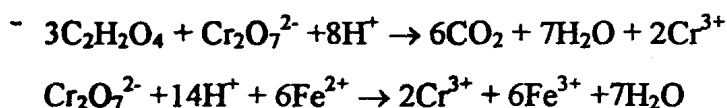
1. pH

Το pH μετρείται ποτενσιομετρικά με πεχάμετρο.

2. Χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (COD)

Αρχή της μεθόδου

Βασίζεται στην οξείδωση των οργανικών ενώσεων με διχρωμικό κάλιο σε ισχυρά όξινο περιβάλλον. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα, π.χ. για το οξαλικό οξύ, είναι οι εξής:



Μεθοδολογία

Γίνεται σε θερμαντική συσκευή. Σε σφαιρική φιάλη των 250,0 ml τοποθετούνται 10,00 ml διαλύματος $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,250 N και 20,0 ml δείγματος. Ακολούθως προστίθενται 30,0 ml διαλύματος Ag_2SO_4 (15,00 g σε 1 L H_2SO_4) προσεκτικά και με συνεχή ανάδευση. Για να διαλυθεί το ίζημα που σχηματίζεται, προσθέτουμε 5,0 ml διαλύματος $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 0,15 M. Ακολουθεί βρασμός για δύο ώρες. Αφήνουμε τις φιάλες να ψυχθούν και ξεπλένουμε τον ψυκτήρα με απεσταγμένο ύδωρ, μέχρις ότου το περιεχόμενο της φιάλης φθάσει τα 150,0 ml.

Η περίσσεια του διχρωμικού καλίου που δεν καταναλώθηκε ογκομετρείται με διάλυμα 0,25 N $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (FAS) και δείκτη φερροΐνη.

Συγχρόνως γίνεται και λευκός προσδιορισμός με 20,0 ml απεσταγμένου ύδατος.

3. Βιοχημικώς Απαιτούμενο Οξυγόνο (BOD)

Αρχή της μεθόδου

Βασίζεται στη μέτρηση του διαλυμένου οξυγόνου που καταναλώνεται σε διάστημα 5 ημερών από τις βιοχημικά διασπώμενες ενώσεις με μανομετρική συσκευή.



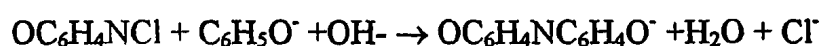
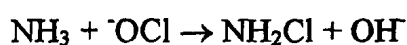
Μεθοδολογία

Ποσότητα δείγματος η οποία εξαρτάται από τη θέση της δειγματοληψίας και την προέλευση του δείγματος) μεταφέρεται σε σκοτεινή γυάλινη φιάλη των 500,0 ml και αναδεύεται συνεχώς με μαγνητικό αναδευτήρα 6x 20 mm. Η μέτρησή του γίνεται σε θάλαμο επώασης θερμοκρασίας 20°C και επειδή απελευθερώνεται CO₂ βάζουμε ένα ισχυρό αλκαλικό αντιδραστήριο (KOH). Η διαφορά της πίεσης δίνει απευθείας την τιμή του BOD.

4. Αμμώνιο (NH₄⁺)

Αρχή της μεθόδου

Βασίζεται στην αντίδραση της αμμωνίας με υποχλωριώδη ιόντα και φαινολικό ιόν προς σχηματισμό ινδοφαινόλης που έχει ζωνρό κυανό χρώμα. Οι αντιδράσεις έχουν ως εξής:



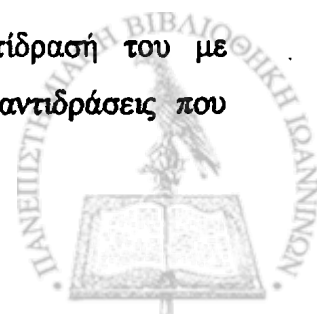
Μεθοδολογία

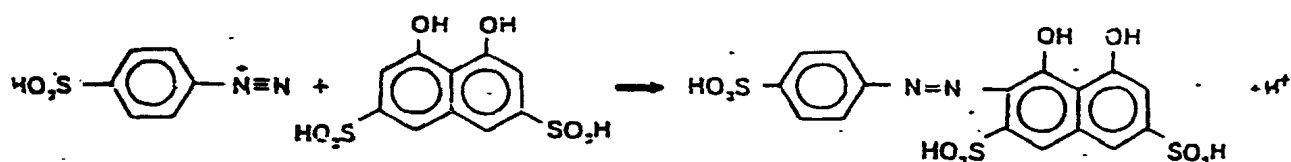
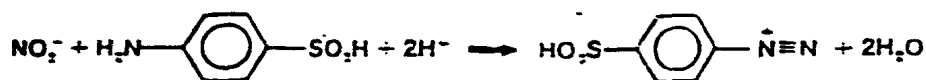
20,00 ml δείγματος μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 ml και προστίθενται 2-3 σταγόνες διαλύματος MnSO₄·H₂O 0,003 M και 0,5 ml υποχλωριώδους οξέος (10,0 ml NaOCl 5% με 40,0 ml H₂O και ρύθμιση του pH στην τιμή 6,7-7). Με συνεχή ανάδευση προστίθενται στάγδην 0,6 ml φαινολικού διαλύματος (2,500 g NaOH και 10,000 g C₆H₅OH στα 100,0 ml H₂O) και συμπληρώνεται η ογκομετρική φιάλη μέχρι την χαραγή με απεσταγμένο ύδωρ. Συγχρόνως, ετοιμάζεται και λευκό δείγμα με 20,00 ml ύδατος καθώς και τέσσερα πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0,5, 1,0, 2,0 και 3,0 mg/L ως προς αμμώνιο. Το κυανό χρώμα που αναπτύσσεται σε 10 λεπτά και είναι σταθερό για τουλάχιστον 24 ώρες, μετρείται φασματοφωτομετρικά στα 655 nm.

5. Νιτρώδη (NO₂⁻)

Αρχή της μεθόδου

Βασίζεται στο σχηματισμό διαζωνιακού άλατος και στην αντίδρασή του με χρωμοτροπικό οξύ προς σχηματισμό κόκκινης αζωένωσης. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι οι παρακάτω:





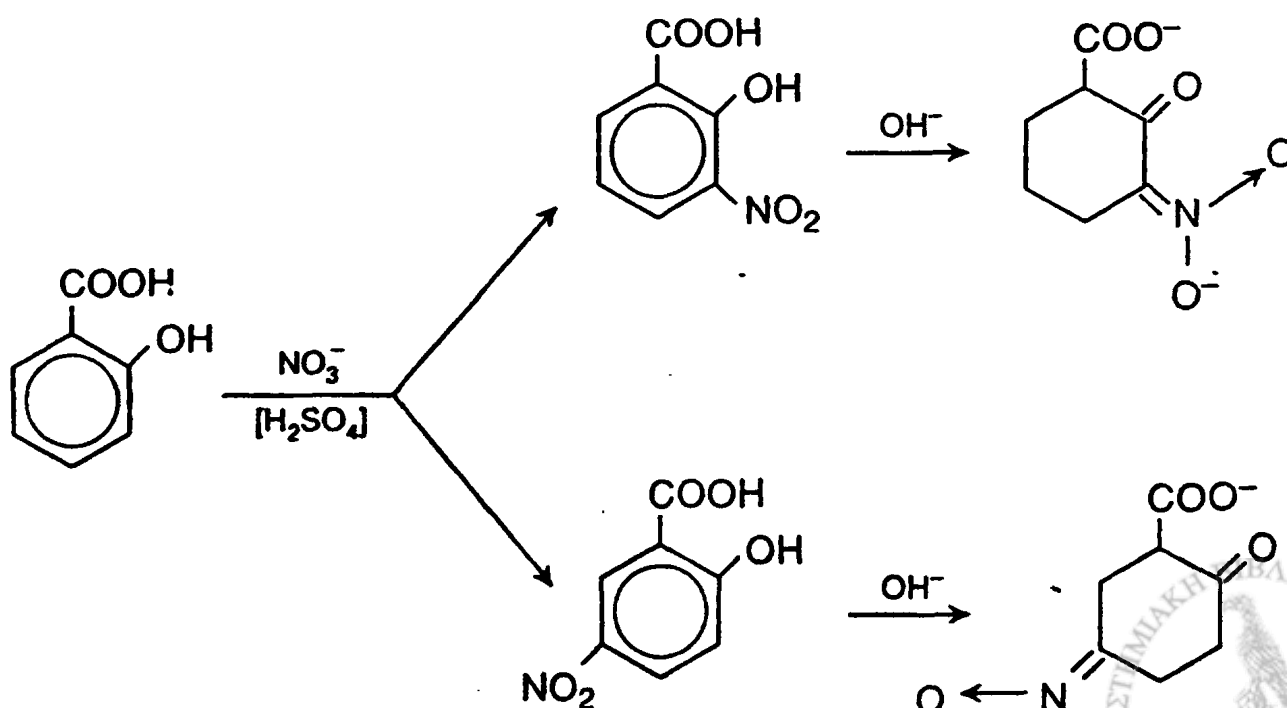
Μεθοδολογία

40,00 ml δείγματος μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 ml, προστίθεται 4,00 ml αντιδραστήριου (0,500 g σουλφανλικού οξέος και 0,050 g χρωμοτροπικού οξέος σε 25,0 ml H₂O και 10 ml HCl 36%, ακολουθεί προσθήκη 13,600 g CH₃COONa·3H₂O και αραιώση του διαλύματος στα 50,0 ml) και συμπληρώνεται μέχρι την χαραγή με απεσταγμένο ύδωρ. Συγχρόνως γίνεται ένα λευκό δείγμα με απεσταγμένο ύδωρ και τέσσερα πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0,1, 0,3, 0,5 και 1,0 mg/L ως προς νιτρώδη. Η μέτρηση γίνεται φασματοφωτομετρικά στα 507 nm μετά από 15 λεπτά.

6. Νιτρικά (NO₃)

Αρχή της μεθόδου

Βασίζεται στην αντίδραση των νιτρικών με σαλικυλικό νάτριο σε όξινο περιβάλλον, προς σχηματισμό νιτροσαλικυλικού ιόντος, το οποίο σε αλκαλικό περιβάλλον είναι κίτρινου χρώματος και μετρείται φασματοφωτομετρικά.



Μεθοδολογία

5,00 ml δείγματος τοποθετούνται σε κάψα πορσελάνης, προστίθενται 2,00 ml διαλύματος σαλικυλικού νατρίου (0,5%) και αφήνονται να εξατμισθούν σε υδατόλουτρο 100°C μέχρι ξηρού.

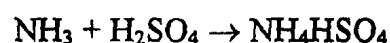
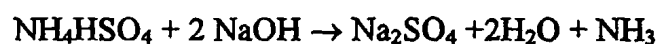
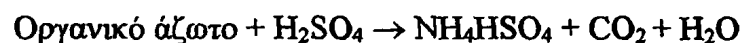
Όταν κρυώσουν προστίθενται 2,00 ml πυκνού H₂SO₄ και τα αφήνουμε για 10 λεπτά. Προστίθεται 15,0 ml αλκαλικού διαλύματος τρυγικού καλιονάτριου (400,0 g NaOH και 60,00 g τρυγικό καλιονάτριο σε 1L H₂O) και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 ml όπου και προστίθεται ύδωρ μέχρι τη χαραγή. Συγχρόνως γίνεται και λευκός προσδιορισμός με απεσταγμένο ύδωρ και τέσσερα πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 3,0, 5,0, 7,0 και 10,0 mg/L ως προς νιτρικά.

Το κίτρινο χρώμα που σχηματίζεται μετρείται φασματοφωτομετρικά στα 420 nm μετά από 10 λεπτά.

7. Ολικό άζωτο κατά Kjeldahl (TNK)Αρχή της μεθόδου

Βασίζεται στη χώνευση του οργανικού αζώτου που περιέχεται στα δείγματα προς αμμωνιακά άλατα με πυκνό θεικό οξύ και τη βοήθεια καταλυτών, στην συνέχεια εξουδετέρωση του οξέος με NaOH σε περίσσεια προς σχηματισμό αμμωνίας που αποστάζει και συλλέγεται σε φιάλη που περιέχει συγκεκριμένο ποσό ενός διαλύματος οξέος. Η περίσσεια του οξέος οπισθογκομετρείται με διάλυμα βάσης και δείκτη ερυθρό του μεθυλίου.

Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι οι εξής:

Μεθοδολογία

Σε φιάλη Kjeldahl των 800 ml μεταφέρονται 100,0 ml δείγματος. Προστίθενται 10,00 ml πυκνού H₂SO₄, 5,0 g K₂SO₄ και 1,0 g CuSO₄. Αφήνονται προς χώνευση για 2 ώρες σε συσκευή Kjeldahl. Όταν αρχίσει η εμφάνιση λευκών ατμών, συνεχίζεται η θέρμανση για 30 λεπτά ακόμη. Όταν το δείγμα αποκτήσει γαλάζιο χρώμα, διακόπτεται η θέρμανση και αφήνεται η φιάλη να ψυχθεί.

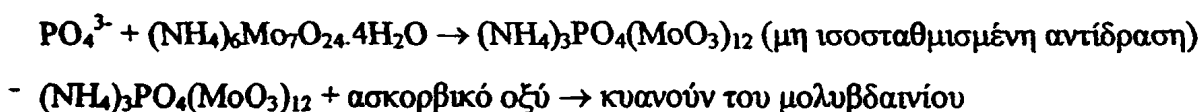


Στη συνέχεια, προστίθενται 200,0 ml H₂O και ποσότητα NaOH 10,0 N ώστε να γίνει αλκαλικό το διάλυμα. Η αμμωνία που απελευθερώνεται αποστάζει και εξουδετερώνεται σε 50,00 ml διαλύματος θειικού οξέος 0,025 N με δείκτη ερυθρό του μεθυλίου. Η περίσσεια H₂SO₄ που απέμεινε τιτλοδοτείται με αραιό διάλυμα NaOH 0,100 N. Συγχρόνως γίνεται και τιτλοδότηση 50,00 ml H₂SO₄ με NaOH 0,100 N.

8. Ορθοφωσφορικά

Αρχή της μεθόδου

Βασίζεται στον σχηματισμό φωσφορομολυβδαινικού αμμώνιου, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται με ασκορβικό οξύ προς κυανούν του μολυβδαινίου. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι οι ακόλουθες:



Μεθοδολογία

10,00 ml δείγματος μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 ml, προστίθενται 16,00 ml αντιδραστηρίου και συμπληρώνεται με απεσταγμένο ύδωρ μέχρι τη χαραγή. Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται ως εξής: 37,5 ml διαλύματος (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0,032 M, αναμιγνύονται με 62,5 ml ασκορβικού οξέος 0,098 M (πάντα πρόσφατα παρασκευασμένο) και με 5,5 ml πυκνού H₂SO₄ σε ογκομετρική φιάλη των 250,0 ml και συμπληρώνονται με απεσταγμένο ύδωρ.

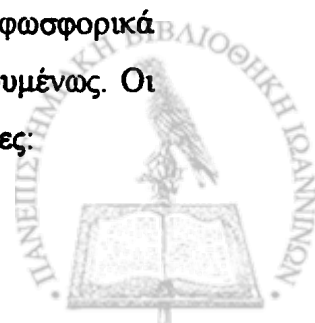
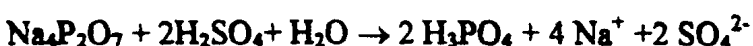
Συγχρόνως γίνεται και λευκός προσδιορισμός με απεσταγμένο ύδωρ και τέσσερα πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0,5, 1,0, 2,0 και 3,0 mg/L ως προς P.

Το κυανούν του μολυβδαινίου που σχηματίζεται μετρείται φασματοφωτομετρικά μετά από 10 λεπτά στα 880 nm.

9. Ολικός φώσφορος

Αρχή της μεθόδου

Βασίζεται στη χώνευση των οργανικά δεσμευμένων φωσφορικών και των συμπυκνωμένων φωσφορικών με θειικό οξύ σε ορθοφωσφορικά. Τα ορθοφωσφορικά προσδιορίζονται στη συνέχεια με την μέθοδο που έχει αναφερθεί προηγουμένως. Οι αντιδράσεις που συμβαίνουν π.χ. για τα πυροφωσφορικά, είναι οι ακόλουθες:





$(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}$ + ασκορβικό οξύ → κυανό του μολυβδαινίου

Μεθοδολογία

Γίνεται χώνευση του δείγματος με τη μέθοδο Kjeldahl (όπως ακριβώς και για το ολικό άζωτο κατά Kjeldahl). Μετά την απόσταξη και εξουδετέρωση της αμμωνίας, το περιεχόμενο της φιάλης εξουδετερώνεται με θειικό οξύ ώστε να γίνει ουδέτερο και αραιώνεται με ύδωρ μέχρι τα 250,0 ml. Από τη φιάλη λαμβάνονται 10,0 ml τα οποία μεταγγίζονται σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 ml, προστίθενται 16,00 ml μίγματος αντιδραστηρίου (όπως στην περίπτωση των ορθοφωσφορικών) και συμπληρώνεται η φιάλη μέχρι τη χαραγή.

10. Αιωρούμενα στερεά

Τα αιωρούμενα στερεά (Total Suspended Solids) προσδιορίζονται με διήθηση με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45 μm ενός συγκεκριμένου όγκου δείγματος, και μετέπειτα ξήρανση του ηθμού στους $104 \pm 1^\circ\text{C}$. Από τη διαφορά βάρους του φίλτρου πριν και μετά τη διήθηση υπολογίζονται τα ολικά αιωρούμενα στερεά.

Η επαναληψιμότητα και τα όρια ανίχνευσης των συμβατικών μεθόδων δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Επαναληψιμότητα και όρια ανίχνευσης των συμβατικών μεθόδων μέτρησης της ποιότητας των απονέρων

Παράμετρος	Επαναληψιμότητα (%)	Όριο ανίχνευσης
COD	12,5	6 mg/L
BOD	12	0,6 mg/L
Αμμώνιο	10	5,5 mg/L
Νιτρώδη	2,4	1 μg/L
Νιτρικά	13,0	8 μg/L
TNK	10,7	-
Ολικός P	13,3	-
Φωσφορικά	0,6	4,5 μg/L



2.4 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑΣ

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα STATISTICA της Statsoft, Inc., 1993 για Windows 4.3.

Καταρχήν, εφαρμόστηκαν οι χημειομετρικές μέθοδοι στα UV δεδομένα 85 δειγμάτων. Τα δείγματα δεν έχουν υποστεί καμία απολύτως επεξεργασία εκτός της αραιώσης όποτε αυτή ήταν αναγκαία. Στα περισσότερα από τα δείγματα έχουν μετρηθεί και οι παράμετροι ποιότητάς τους. Η περιοχή του φάσματος που χρησιμοποιήθηκε για τις παρακάτω μεθόδους είναι από 210-329 nm.

A. Νευρωνικά Δίκτυα (Μάθηση με επίβλεψη)

Το νευρωνικό δίκτυο που χρησιμοποιήθηκε για την ταξινόμηση των δειγμάτων είναι το δίκτυο RBF (Radial Basis Function). Το δίκτυο αυτό αποτελεί ένα δεδομένο μοντέλο νευρωνικού δικτύου. Οι μονάδες επεξεργασίας (νευρώνες) σε αυτό το νευρωνικό δίκτυο είναι οργανωμένες σε τρία στρώματα (layers). Η αρχιτεκτονική του δικτύου περιλαμβάνει ένα στρώμα εισόδου στο οποίο εισάγονται οι τιμές του φάσματος (όσα και τα μήκη κύματος), ένα ενδιάμεσο ('κρυμμένο') στρώμα με νευρώνες τύπου RBF και ένα στρώμα εξόδου με νευρώνες με σιγμοειδή συνάρτηση ενεργοποίησης: $\sigma(x) = 1/(1 + e^{-x})$. Τέλος, το στρώμα εξόδου περιλαμβάνει τέσσερις νευρώνες (όσες και οι κατηγορίες των δειγμάτων) σε σιγμοειδή συνάρτηση ενεργοποίησης. Κάθε νευρώνας εξόδου αντιστοιχεί σε μία κατηγορία. Όταν το φάσμα κάποιου δείγματος τροφοδοτείται ως είσοδος στο δίκτυο, υπολογίζονται τελικά οι τιμές των τεσσάρων εξόδων και με βάση τις τιμές αυτές το δείγμα ταξινομείται στην κατηγορία που αντιστοιχεί στην έξοδο με τη μεγαλύτερη τιμή. Από το σύνολο των δειγμάτων τα 60 περίπου χρησιμοποιήθηκαν για το σύνολο εκπαίδευσης και τα 20 για το σύνολο δοκιμής.

Η διαδικασία που εφαρμόστηκε περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

1) Δημιουργία του συνόλου δεδομένων, λογαρίθμηση των τιμών του φάσματος και κωδικοποίηση των τεσσάρων κατηγοριών των δειγμάτων.



- 2) Καθορισμός της αρχιτεκτονικής του νευρωνικού δικτύου και του αριθμού των νευρώνων σε κάθε στρώμα.
- 3) Εκπαίδευση του νευρωνικού δικτύου χρησιμοποιώντας ένα ποσοστό του συνόλου δειγμάτων: διαδοχική εφαρμογή των τιμών απορρόφησης στα διάφορα μήκη κύματος των φασμάτων ως εισόδων στο δίκτυο, υπολογισμός των εξόδων και αναπροσαρμογή των τιμών των βαρών στην περίπτωση που το δίκτυο προβλέπει λάθος κατηγορία για κάποιο δείγμα.
- 4) Αξιολόγηση της ικανότητας διαχωρισμού του δικτύου με βάση τις κατηγοριοποιήσεις που παρέχει, αν βάλουμε ως εισόδους τα υπόλοιπα δείγματα που δεν χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπαίδευση.

B. Ανάλυση σε συστάδες (Μάθηση χωρίς επίβλεψη)

Πριν την εφαρμογή της ανάλυσης σε συστάδες, για να μετατρέψουμε τα δεδομένα σε άλλη μορφή, χρησιμοποιήσαμε ως τεχνική προεπεξεργασίας την κανονικοποίηση των τιμών, αίροντας έτσι την επίδραση της αραίωσης. Η κανονικοποίηση έγινε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\%A_i = 100 \times \frac{A_i}{\sum_{i=210}^{329} A_i}$$

(για κάθε φάσμα).

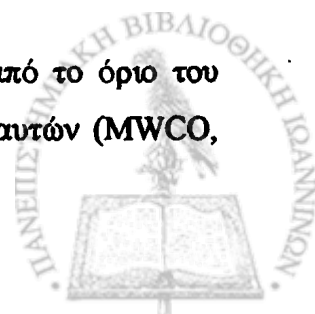
Ως κριτήριο για τη μέτρηση της ομοιότητας των τιμών χρησιμοποιήθηκε η ευκλείδια απόσταση, ενώ για το σχηματισμό των συστάδων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του απώτερου γείτονα ή αλλιώς πλήρους δεσμού.

2.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

A. Διαπίδυση

Μεμβράνες

Οι μεμβράνες διακρίνονται όσον αφορά την διαπερατότητά τους από το όριο του μοριακού βάρους (MB) ενώσεων που μπορούν να διέλθουν μέσω αυτών (MWCO,



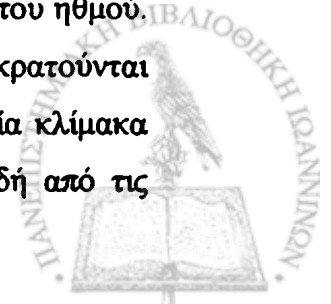
Molecular weight Cut-Off). Στην εργασία αυτή χρησιμοποιούνται δύο είδη μεμβρανών από την εταιρία SERVA με διαφορετικό MWCO. Η πρώτη είναι από αναγεννημένη κυτταρίνη και έχει MWCO 12000-19000 (μεμβράνη 1) και η δεύτερη από εστέρα κυτταρίνης και έχει χαμηλό MWCO 500 (μεμβράνη 2).

Προετοιμασία των μεμβρανών

Οι μεμβράνες από αναγεννημένη κυτταρίνη συνήθως περιέχουν βαρέα μέταλλα όπως σίδηρο, ψευδάργυρο, κασσίτερο σε συγκεντρώσεις που μπορεί να φθάνουν τα 1-10 mg/L. Επίσης, μπορεί να περιέχουν 0,1% θειούχα λόγω της επεξεργασίας που έχουν υποστεί. Για να απομακρυνθούν τα παραπάνω γίνεται η διαδικασία που περιγράφεται ήδη στο Παράρτημα. Οι μεμβράνες από εστέρα κυτταρίνης δεν περιέχουν προσμίξεις, είναι όμως λιγότερο ανθεκτικές στους οργανικούς διαλύτες και στα υψηλά pH σε σχέση με τις προηγούμενες μεμβράνες. Οι μεμβράνες ξεπλένονται πολύ καλά με απεσταγμένο ύδωρ, με οξικό οξύ, με απεσταγμένο ύδωρ για δεύτερη φορά, με διάλυμα που έχει παρασκευασθεί με ανάμιξη EDTA και NaHCO_3 , όπως αναφέρεται στο πρωτόκολλο, και τέλος με απεσταγμένο ύδωρ.

Επεξεργασία των δειγμάτων

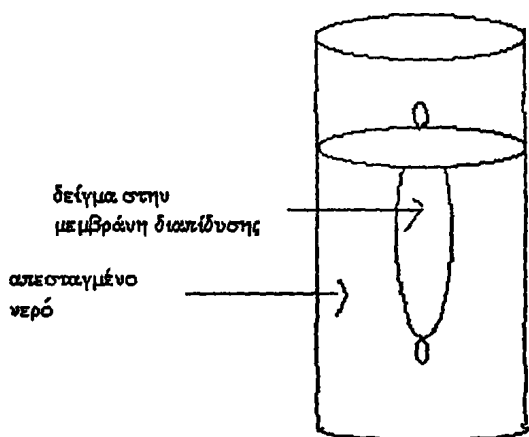
Τα δείγματα που είναι είτε απόβλητα διαφορετικής προέλευσης, είτε επιφανειακά νερά, διηθούνται με γυάλινο προ-φίλτρο της εταιρίας Millipore 0,8 μm . Η διήθηση γίνεται για να απομακρυνθούν τα αιωρούμενα στερεά που έχουν τα δείγματα. Όταν είναι αναγκαίο μπορεί να γίνει και μια δεύτερη διήθηση με ηθμό οξικής κυτταρίνης (εταιρίας S&S, OE66) 0,2 μm για να απομακρυνθούν και οι μικροοργανισμοί. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η έμφραξη των πόρων της μεμβράνης. Τα κολλοειδή, περιγράφονται ως σωματίδια ενδιάμεσου μεγέθους, μεταξύ αιωρούμενων και διαλυμένων. Ο καθορισμός του μεγέθους των ενώσεων στις διάφορες κατηγορίες είναι κάπως αυθαίρετος, λόγω του συνεχόμενης κλίμακας MB ενώσεων που περιέχονται στα φυσικά νερά. Το όριο αποκλεισμού των κολλοειδών σωματιδίων μπορεί να έχει κάπως καθοριστεί, αλλά τα περισσότερα κολλοειδή μπορεί να περιγραφούν από την ικανότητά τους να παραμείνουν σε αιώρηση στα διαλύματα, παρά να καταβυθιστούν ή να διηθηθούν από το διάλυμα μέσω των πόρων του ηθμού. Κάποιες μελέτες ορίζουν τα κολλοειδή ως τα σωματίδια που κατακρατούνται αυστηρά με τη μικροδιήθηση¹⁵³, ενώ άλλες χρησιμοποιούν μία πιο ευρεία κλίμακα ταξινόμησης για τα κολλοειδή σωματίδια¹⁵⁴. Για τα οργανικά κολλοειδή από τις



εκροές, η πιο συνήθης καθορισμένη κλίμακα βρίσκεται μεταξύ του μεγέθους μικροδιήθησης (0,7 έως 0,2 μm) και της υπερδιήθησης ή διαπίδυσης (MWCO μεταξύ 2000 και 3500).

Πορεία

Τα δείγματα εισάγονται στις μεμβράνες μετά την παραπάνω επεξεργασία είτε ως έχουν είτε αραιωμένα (ανάλογα με την απορρόφηση του αρχικού δείγματος). Η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε ογκομετρικό σωλήνα που περιέχει απεσταγμένο ύδωρ και όχι κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα. Στο σχήμα 2.1 δίνεται η διάταξη όπως χρησιμοποιήθηκε. Η ποσότητα του ύδατος είναι ίση με την ποσότητα του δείγματος στο εσωτερικό της μεμβράνης. Αυτό γίνεται για λόγους σύγκρισης των φασμάτων. Τα δείγματα εισάγονται και στις δύο μεμβράνες ταυτοχρόνως και αφήνονται 24 ώρες για την επίτευξη της ισορροπίας.



ΣΧΗΜΑ 2.1: Η διάταξη για τον διαχωρισμό των ενώσεων με τις μεμβράνες διαπίδυσης

Ενώσεις αναφοράς

Οι ενώσεις αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να παρατηρήσουμε τη συμπεριφορά των μεμβρανών έπρεπε να έχουν MB κοντά στα MWCO των μεμβρανών, να απορροφούν στο υπερίωδες και όσο γίνεται να βρίσκονται πιο κοντά στις ενώσεις των δειγμάτων που εξετάζονται. Είναι περιορισμένος ο αριθμός των ενώσεων αυτών. Έτσι, επιλέχθηκαν πρωτεΐνες, όπως είναι η αιμογλοβίνη και η αλβουμίνη από βοδινό ορό, πεπτίδια όπως η ινσουλίνη, ουρία και υδατάνθρακες όπως

είναι η κυανή δεξτράνη και ένα πεπτίδιο. Τα μοριακά βάρη, η συγκέντρωση, το ισοηλεκτρικό σημείο των ενώσεων δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Ενώσεις αναφοράς, MB, συγκέντρωση και παρατηρήσεις

Ένωση	MB (Da)	pI	Καθαρό- τητα	Συγκέ- ντρωση (mg/ml)	Παρατηρήσεις
Αμογλοβίνη	65000	-	Λυοφιλο- ποιημένη σκόνη	0,3	2 αλυσίδες α-έλικα και 2 αλυσίδες β- πτυχωτή επιφάνεια ενωμένες μη ομοιοπολικά
- Κυανή δεξτράνη	$2 \cdot 10^6$	-	0,1 mmol δραστικής ένωσης μπλε 2/ g δεξτράνης	0,11	υδατάνθρακας
Σύμπλοκο με ρουθίνιο	>500	-	-	0,041	Θετικά φορτισμένο
Αλβουμίνη από βόειο ορό	65000	4,7	Για μοριακή βιολογία	0,028	68-50% α-έλικα, 18-16% β-πτυχωτή επιφάνεια
Ινσουλίνη	3496	5,3	87 %	0,012	2 αλυσίδες ενωμένες ομοιοπολικά
ουρία	60,06	-	99,5 %	0,582	Ουδέτερη, υπόκειται σε ταυτομερισμό



Πραγματικά δείγματα

Στα δείγματα που μελετήθηκαν μετρήθηκαν καταρχήν οι παράμετροι ποιότητάς τους. Επίσης, κάποια από τα χαρακτηριστικά που έχουν τα φάσματα των δειγμάτων αυτών μετά από τα στάδια προετοιμασίας που έχουν ακολουθηθεί (τα φάσματα αυτά είναι σχεδόν ίδια με τα φάσματα των ακατέργαστων δειγμάτων). Τα φάσματα των δειγμάτων δίνονται στην παρακάτω ενότητα, όπου μελετώνται ξεχωριστά.

Τα φάσματα των δειγμάτων που εισήχθησαν στις μεμβράνες διαπίδυσης, τα φάσματα των δειγμάτων που παρέμειναν στο εσωτερικό και εκείνα που προέκυψαν στο εξωτερικό της κάθε μεμβράνης μελετήθηκαν για να δούμε τη διαφοροποίησή τους.

Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων

Τα UV φάσματα των πραγματικών δειγμάτων που ελήφθησαν με την τεχνική της κλασμάτωσης με μεμβράνες, κατηγοριοποιήθηκαν με την 'Ανάλυση σε συστάδες'. Για την προεπεξεργασία των δεδομένων έγινε κανονικοποίηση των τιμών της απορρόφησης εκάστου φάσματος στην περιοχή 200-400 nm, σύμφωνα με τον τύπο:

$$A_{\lambda_i} \% = A_{\lambda_i} / \Sigma A_{\lambda_i} \times 100$$

Ως κριτήριο για τη μέτρηση της ομοιότητας χρησιμοποιήθηκε η Ευκλείδια απόσταση και για το σχηματισμό των συστάδων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Ward.

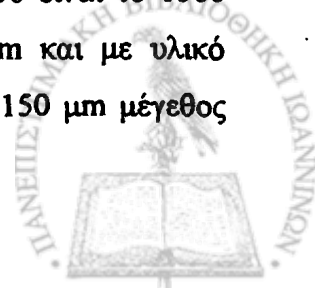
B. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους

Όργανα

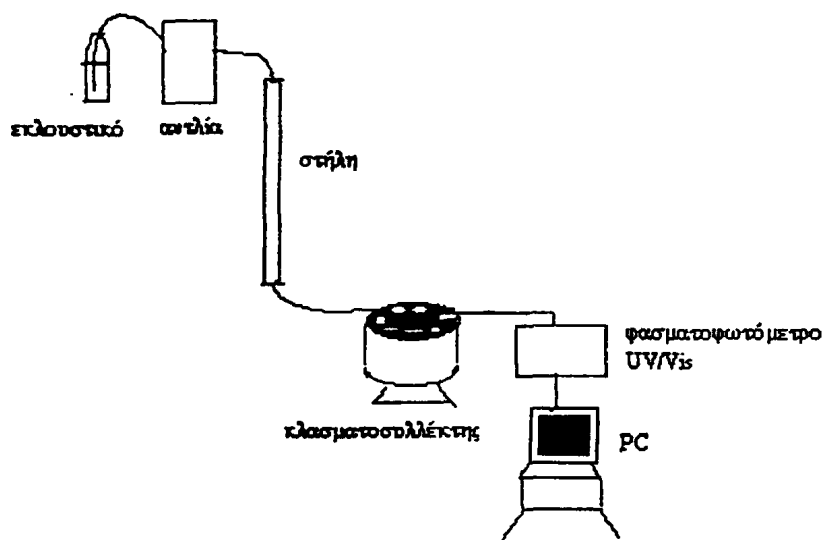
Φασματοφωτόμετρο UV/Vis της SECOMAM, με κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm,
Συλλέκτης κλασμάτων REDIFRAC (Pharmacia),
Περισταλτική αντλία της εταιρίας Gilson Miniplus 2

Στατική φάση

Χρησιμοποιήθηκαν δύο στήλες: η μία με διαστάσεις 1,6 cm διάμετρο και ύψος 40 cm που έχει πληρωθεί με υλικό Sephadex G-15 της εταιρίας Pharmacia (40-120 μm μέγεθος ξηρού σφαιριδίου). Το όριο αποκλεισμού του υλικού αυτού είναι το 1500 Da. Η δεύτερη με διαστάσεις 1,6 cm διάμετρο και ύψος 100 cm και με υλικό πλήρωσης το Sephadex G-25 Medium της εταιρίας Pharmacia (50-150 μm μέγεθος



ξηρού σφαιριδίου). Το υλικό αυτό έχει όρια αποκλεισμού 5000 έως 1000 Da. Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης στις δύο στήλες είναι 0,76 ml/min για όλους τους διαχωρισμούς. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε δίνεται στο σχήμα 2.2.



ΣΧΗΜΑ 2.2 : Η διάταξη για την χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους

Κινητή φάση

Χρησιμοποιήθηκαν τρία ρυθμιστικά διαλύματα με διαφορετικές τιμές pH. Όταν το pH της κινητής φάσης είναι μεγαλύτερο του pI τα πεπτίδια είναι αρνητικά φορτισμένα, ενώ όταν είναι μικρότερο του pI είναι θετικά φορτισμένα.

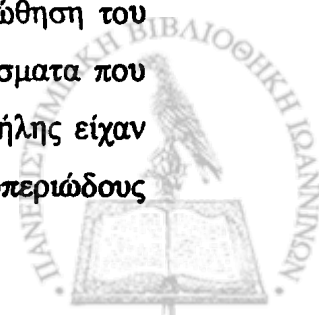
1) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 6,4. Παρασκευάζεται με ανάμιξη 754,0 ml διαλύματος KH_2PO_4 0,0667 M και 246,0 ml διαλύματος Na_2HPO_4 0,0667 M.

2) ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών, pH 9,6. Παρασκευάζεται με ανάμιξη 500,0 ml διαλύματος NaHCO_3 0,05 M και 50 ml διαλύματος NaOH 0,1 M και αραίωση μέχρι τελικού όγκου 1 L.

3) ρυθμιστικό διάλυμα όξινου φθαλικού καλίου, pH 4,4. Παρασκευάζεται με ανάμιξη 500,0 ml διαλύματος KHP 0,1 M και 87 ml διαλύματος NaOH 0,1 M και αραίωση μέχρι τελικού όγκου 1 L.

Μεθοδολογία

Όγκος δείγματος περίπου 5-7 ml στην πρώτη στήλη και 2-3 ml στη δεύτερη στήλη εισάγονταν στην κορυφή της καθεμιάς με τη βοήθεια σύριγγας. Η προώθηση του εκλουστικού γίνονταν με τη βοήθεια της περισταλτικής αντλίας. Τα κλάσματα που συλλέγονταν σε πλαστικά σωληνάκια με το συλλέκτη στην έξοδο της στήλης είχαν μέγεθος 100 σταγόνες. Ελήφθησαν τα UV φάσματα στην περιοχή του υπεριώδους



(200-400 nm). Η απορρόφηση καταγράφονταν στα 210 ή 215 nm για τις πρότυπες ενώσεις προκειμένου να βρεθεί σε ποιο κλάσμα εκλούονταν.

Ενώσεις αναφοράς

Η τεχνική χρησιμοποιείται για ενώσεις υψηλού MW όπως πολυπεπίδια, υδατάνθρακες και άλλα πολυμερή. Τα απόβλητα ενδέχεται να περιέχουν πεπίδια, πρωτεΐνες που απορροφούν ακτινοβολία UV/Vis, και γι' αυτό προχωρήσαμε στην εφαρμογή της τεχνικής αυτής στα λύματα. Για τη βαθμονόμηση των στηλών χρησιμοποιήθηκαν τα πεπίδια που αναφέρονται στον πίνακα 3. Στον πίνακα αυτό δίνονται το MW, η καθαρότητα (%), το pH των ενώσεων σε υδατικό διάλυμα, το pI (ισοηλεκτρικό σημείο) τους, καθώς και το φορτίο τους στα εκλουστικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν. Το ισοηλεκτρικό σημείο έχει υπολογιστεί για τις περισσότερες από τις πολυπεπτιδικές ενώσεις θεωρητικά με το πρόγραμμα Compute pI/Mw που είναι διαθέσιμο από τον ExPASy (Expert Protein Analysis System) proteomics server του Swiss institute of Bioinformatics¹⁵⁵.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

Πεπίδιο	MW	Καθαρότητα (%)	pH δ/τος	pI	Σε pH 4,4	Σε pH 6,4	Σε pH 9,6
Εξαγλυκίνη	360,3	-	4,17	5,52	(+)	(-)	(-)
Εξατυροσίνη	997,1	99	-	5,52	(+)	(-)	(--)
Απροτινίνη	6500	-	7,40	10,50	(++)	(++)	(+)
Βραδυκινίνη	1060,2	99,7	4,00	12,00	(++)	(++)	(+)
Ίνσουλίνη Β Οξειδωμένη	3495,9	87	5,81	5,30	(+)	(-)	(--)
Τριπεπίδιο	375	-	5,00	6,92	(+)	(-) ή ουδέτερο	(-)
Τετραπεπίδιο	409	-	6,84	5,33	(+)	(-)	(--)
Δεκαπεπίδιο	1155	-	6,27	≈ 5	(+)	(-)	(--)
glycin	167,2	-	-	-			

Τριπεπτιδίο: His-Val-His (ουδέτερο)

Τετραπεπτιδίο: His-Val-Gly-Asp (ουδέτερο)

Δεκαπεπτιδίο: p-Glu-His-Trp-Ser-Gly-Leu-Gln-Pro-Gly-NH₂

Glycin: η ένωση αυτή ονομάζεται και N-(4-υδροξυφαινυλο)-γλυκίνη

Πραγματικά δείγματα

Τα δείγματα υπεβλήθησαν σε χρωματογραφία SEC για να διαχωριστούν οι περιεχόμενες ενώσεις σύμφωνα με το μέγεθός τους. Η επεξεργασία που υπέστησαν πριν την εισαγωγή τους στη στήλη είναι η διήθηση με τα γυάλινα προ-φίλτρα Whatman 0,8 μm και με τα φίλτρα 0,22 μm (εταιρίας S&S, OE66). Δεν έχει γίνει απολύτως καμία αραίωση ή συμπύκνωση στα δείγματα αυτά γιατί οποιαδήποτε επεξεργασία είναι πιθανόν να επηρεάσει τη δομή των ενώσεων ⁴⁶. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι αυτή που περιέχει το υλικό Sephadex G-25. Χρησιμοποιήθηκαν τρία είδη αποβλήτων: αστικά, νοσοκομειακά και βιομηχανικά (από βιομηχανία γάλακτος). Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους έχουν μετρηθεί με τις συμβατικές μεθόδους

Επίσης, για καθένα από τα δείγματα έχει ληφθεί το UV φάσμα του, και κατόπιν τα UV φάσματα των κλασμάτων που έχουν μεγάλες χρωματογραφικές κορυφές.

Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων

Τα UV φάσματα των κλασμάτων των πραγματικών δειγμάτων που ελήφθησαν με τη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους κατηγοριοποιήθηκαν με την ανάλυση σε συστάδες. Για την προεπεξεργασία των δεδομένων έγινε λογαρίθμηση της απορρόφησης και παραγωγή του φάσματος των λογάριθμων στην περιοχή 200-400 nm. Ως κριτήριο για τη μέτρηση της ομοιότητας χρησιμοποιήθηκε η Ευκλείδεια απόσταση και για τον σχηματισμό των συστάδων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Ward.

Γ. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης

Αντιδραστήρια

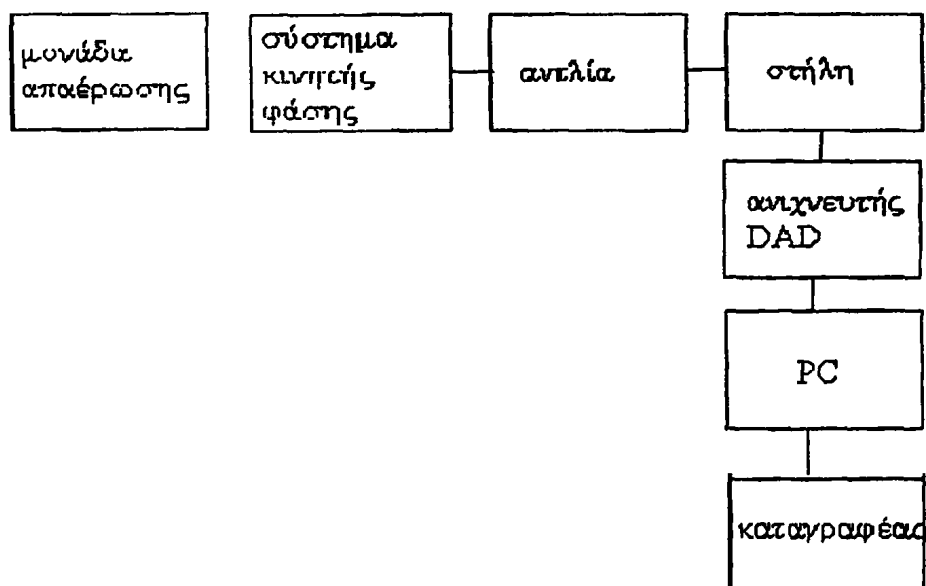
Οι τρεις διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν: ακετονιτρίλιο (MeCN), μεθανόλη (MeOH) και τετραϋδροφουράνιο (THF) είναι καθαρότητας 99,9% από την εταιρία Merck. Το



ύδωρ ήταν πάντοτε πρόσφατα απεσταγμένο. Η απαέρωση των διαλυτών γίνονταν με He καθαρότητας 99,999%.

Συσκευή

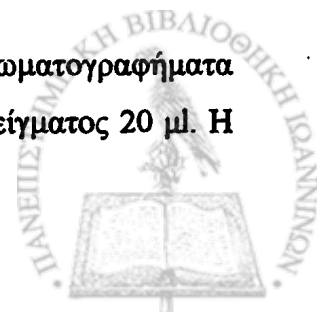
Η συσκευή HPLC που χρησιμοποιήθηκε ήταν από την εταιρία Shimadzu. Αποτελείται από την αντλία ανάμιξης χαμηλής πίεσης (FCV 10AL), από τη μονάδα απαέρωσης (DGU-2A) και από τον ανιχνευτή πολλαπλών διόδων (SPD-M6A). Η στήλη που γίνεται ο διαχωρισμός είναι μία στήλη δεκαοκτυλο σιλοξανίου δεμένης φάσης (μέγεθος τεμαχιδίων 5 μm) και μέγεθος πόρων 100 Å. Έχει διαστάσεις 2,6 mm διάμετρο και 25 cm ύψος και είναι αγορασμένη από την Jones Chromatography. Το όλο σύστημα υποστηρίζονταν με ηλεκτρονικό υπολογιστή για την αποθήκευση των δεδομένων και την επεξεργασία τους, και τα φάσματα λαμβάνονταν σε πραγματικό χρόνο (real time). Επιπλέον, υπήρχε κατάλληλο λογισμικό υπολογισμού (SPD-MXA) της καθαρότητας των κορυφών και παρουσίασης των χρωματογραφημάτων σε τρισδιάστατη μορφή. Στο σχήμα 2.3 απεικονίζεται η διάταξη της χρωματογραφικής συσκευής που χρησιμοποιήθηκε για τους διαχωρισμούς.



ΣΧΗΜΑ 2.3 : Συνδεσμολογία της συσκευής HPLC που χρησιμοποιήθηκε

Συνθήκες

Η ταχύτητα ροής του εκλουστικού παρέμεινε σταθερή για όλα τα χρωματογραφήματα και ίση με 1,0 ml.min⁻¹. Ο βρόγχος έγχυσης είναι χωρητικότητας δείγματος 20 μl . Η



στήλη μετά από κάθε χρωματογράφημα ξεπλένονταν καλά με ύδωρ και ακετονιτρίλιο. Η σειρά των διαλυτών που θα χρησιμοποιούνταν για την έκπλυση εξαρτώνταν κάθε φορά από τη σύσταση που είχε το προηγούμενο εκλουστικό. Μετά την έκπλυση και πριν από κάθε χρωματογράφημα η στήλη για λίγα λεπτά εξοικειώνονταν (εγκλιματίζονταν) με το εκλουστικό που θα χρησιμοποιούνταν για την εκτέλεση της χρωματογράφησης.

Προετοιμασία των δειγμάτων

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από το βιολογικό καθαρισμό αστικών λυμάτων και από το βιολογικό καθαρισμό μίας γαλακτοβιομηχανίας. Η μέθοδος προετοιμασίας που ακολουθήθηκε για τα δείγματα έχει ως εξής: Το δείγμα αρχικά υφίσταται μικροδιήθηση με γυάλινο προ-φίλτρο 0,8 μm (Millipore) και έπειτα με φίλτρο μεγέθους πόρων 0,22 μm (Schleicher & Schuell, OE66). Ποσότητα διηθημένου δείγματος περίπου 200-250 ml τοποθετείται στη φιάλη ενός περιστροφικού εξατμιστή που λειτουργεί υπό μειωμένη πίεση και σε θερμοκρασία που κυμαίνεται μεταξύ 60-90°C το δείγμα αφήνεται να συμπυκνωθεί. Ο τελικός όγκος του συμπυκνώματος που επιλέχθηκε κυμαίνονταν ανάλογα με τις αρχικές παραμέτρους ποιότητας του ακατέργαστου δείγματος συνήθως μεταξύ 5 και 15 ml. Έπειτα, το συμπυκνωμένο δείγμα φυγοκεντρείται στις 5500 rpm για 10 λεπτά για να απομακρυνθεί το τυχόν ίζημα. Ο όγκος δείγματος που εισάγεται στην στήλη διαχωρισμού είναι 20 μl.

Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων

Στα δεδομένα (φάσματα) που πήραμε από την ισοκρατική έκλυση του δείγματος με διάφορα εκλουστικά υγρά εφαρμόστηκε η τεχνική μάθησης χωρίς επίβλεψη, δηλαδή η Ανάλυση σε συστάδες. Ως μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν οι 200 μετρήσεις απορρόφησης (A) στα μήκη κύματος από 200 μέχρι 400 nm, για κάθε κορυφή. Οι μετρήσεις μετατράπηκαν σύμφωνα με τον τύπο:

$$A_{\lambda_i} \% = A_{\lambda_i} / \sum A_{\lambda_i} \times 100$$



ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΦΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΣΕ ΑΝΤΙΠΑΡΑΘΕΣΗ

Στον πίνακα 1 δίνονται οι παράμετροι ποιότητας των δειγμάτων σε mg/L καθώς και η αραίωση που γίνονταν στο κάθε δείγμα προκειμένου να ληφθεί το UV φάσμα του.

Τα σύμβολα M, P, U, D σημαίνουν δείγματα προερχόμενα από τις εισόδους αντίστοιχα του βιολογικού καθαρισμού αστικών λυμάτων, του βιολογικού καθαρισμού του Δημόσιου νοσοκομείου, του βιολογικού καθαρισμού του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου, του βιολογικού καθαρισμού της βιομηχανίας γαλακτοκομικών προϊόντων, ενώ τα σύμβολα L και R σημαίνουν νερό λίμνης και ποταμού, αντίστοιχα.

3.1.1 Νευρωνικά Δίκτυα

Κατά την εκπαίδευση του νευρωνικού δικτύου παρατηρήθηκε ότι καλύτερα αποτελέσματα προκύπτουν εάν αντί να χρησιμοποιήσουμε και τις 120 τιμές του φάσματος ως εισόδους στο νευρωνικό δίκτυο, χρησιμοποιήσουμε κάθε όγδοη τιμή αγνοώντας τις υπόλοιπες επτά, δηλαδή το δίκτυο να έχει 15 εισόδους. Ο αριθμός των μονάδων του κρυμμένου επίπεδου τέθηκε ίσος με οκτώ. Για το υπολογισμό της ικανότητας ταξινόμησης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος 10-fold διασταυρούμενης αξιολόγησης (cross validation) και το ποσοστό επιτυχίας στη ταξινόμηση ενός δείγματος στη σωστή κατηγορία βρέθηκε 77%.

Θεωρείται σχετικά καλό το ποσοστό επιτυχίας αυτό, μόνο αν σκεφτούμε την πολυσυστατικότητα των δειγμάτων και το γεγονός ότι δεν προηγήθηκε καμία



απολύτως επεξεργασία στα δείγματα αυτά (εκτός της αραίωσης) για να ληφθεί το UV φάσμα τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Παράμετροι ποιότητας διαφόρων ειδών απονέμων

ΔΕΙΓ- ΜΑ	Ημ/ via	COD	TKN- NH ₄	N- NH ₄	N- NO ₃	P-PO ₄	T- PO ₄	BOD	TSS	pH	Αρ/ ση
P1	27/1/94	518	-	22,8	27,5	7,4	10,4	285,4	-	-	8
M1	8/2/94	158,8	24,4	2,1	17,1	6,6	6,6	80,2	-	-	2
M2	28/2/94	185	3,4	0,0	0,0	-	-	45,1	-	-	2
M3	10/3/94	588,8	-	-	-	-	-	-	-	-	2
M4	28/6/94	216,6	83,7	38,5	0,0	6,3	9,3	11,6	-	-	-
L1	20/7/94	140,3	0,0	0,0	0,0	0,5	2,8	6,8	-	-	-
M5	17/8/94	693	33,1	12,3	0,0	12,6	21,5	231,5	-	-	4
D1	22/9/94	817,5	45,1	16,8	0,0	22,3	29,8	1424,4	-	-	10
U1	3/10/94	306	29,6	2,4	0,0	6,2	11,7	271,3	-	-	4
L2	17/10/94	123,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,4	-	-	-
M6	9/11/94	207,5	14,6	3,9	0,0	3,8	4,3	-	-	-	-
D2	9/11/94	379,2	29,2	28,9	0,0	6,2	11,7	947,5	-	-	2
U2	25/11/94	462,1	17,2	-	0,0	18,8	22	165,7	-	-	4
D3	14/12/94	1196,6	37,1	7,6	0,0	25,1	32,5	1117,5	-	-	10
P2	13/1/95	453	36,4	20,3	0,0	3,8	8,7	227,2	-	-	10
U3	6/2/95	331,8	16,8	10,1	0,0	14,4	39	179,5	-	-	4
L3	16/2/95	62,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,1	-	-	-
D4	22/2/95	1975,4	84,4	1,56	0,0	46,6	-	595,9	-	-	20
M7	15/3/95	81,3	4,0	0,0	0,0	1,7	22,5	49,5	-	-	-
L4	11/3/95	37,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0	-	-	-
M8	19/6/95	876,4	-	-	0,0	-	-	370,4	-	-	10
M9	21/6/95	372,4	-	-	0,0	-	-	362,5	-	-	10
M10	23/6/95	263,8	-	-	0,0	-	-	220,4	-	-	-
M11	17/8/95	650,1	-	-	0,0	-	-	390,1	-	-	10
M12	21/8/95	267,3	-	-	0,0	-	-	277,5	-	-	4
M13	24/8/95	771,1	-	-	0,0	-	-	877	-	-	10
D5	24/4/01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
L5	21/5/01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L6	21/5/01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L7	1/6/01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M14	1/6/01	557	-	69,6	-	-	-	-	736	7,31	5
D6	1/6/01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
L8	2/6/01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L9	2/6/01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U4	28/6/01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
U5	28/6/01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
L10	13/7/01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L11	13/7/01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M15	19/7/01	516	-	56,5	-	9,5	-	-	1026	7,39	2
R1	19/7/01	144	-	23	2,9	8,0	-	-	-	7,44	-
D7	25/7/01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
M16	25/7/01	391	-	46,5	-	6,25	-	-	227,8	7,69	2
M17	26/7/01	1082	-	93,5	-	10	-	-	1200	7,57	2
M18	3/8/01	641	-	77,5	-	10,25	-	-	792,6	7,59	4
D8	3/8/01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
L12	8/8/01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L13	8/8/01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M19	10/8/01	808	-	80,5	-	8,75	-	-	744	7,17	3
M20	22/8/01	334	-	46,5	-	5,25	-	-	255,5	7,33	2
P3	22/8/01	800	-	34	3,5	3,5	-	-	-	-	2
P4	22/8/01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
P5	10/10/01	794	-	27,2	18,2	2,25	-	-	168,5	7,66	6
M21	10/10/01	462	-	151	-	9,75	-	-	898,5	7,47	4
R2	11/10/01	80	-	0,12	2,2	0,0	-	-	-	8,10	-
M22	16/10/01	313	-	63	-	8,75	-	-	474,2	7,51	2

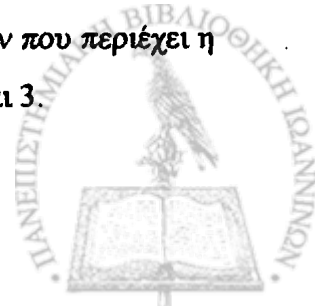
M23	17/10/01	1956	-	107	-	9,50	-	-	1034	7,64	5
M24	25/10/01	397	-	93	-	5,75	-	-	373	7,64	3
D9	25/10/01	2105	-	22,5	22	26,2	-	-	-	6,85	10
P6	31/10/01	500	-	3,50	6,5	3,50	-	-	186,3	6,87	8
M25	31/10/01	451	-	92	-	7,50	-	-	436,2	7,67	3
M26	15/11/01	298	-	49	-	3,75	-	-	117,1	7,78	3
M27	21/11/01	2696	-	96,2	-	9,45	-	-	627,3	7,69	5
M28	26/11/01	367	-	98	-	5,25	-	-	436	7,85	3
M29	28/11/01	446	-	78	-	18,5	-	-	515	7,64	4
D10	29/11/01	8500	-	80	-	40	-	-	-	5,62	40
P7	5/12/01	655	-	18,5	9,5	5,50	-	-	132,2	9,05	20
P8	11/6/02	788	78,4	30	-	9,25	-	-	214	8,12	5
D11	20/6/02	2772	98	15,5	16	-	-	-	767,5	9,28	10
L14	20/6/02	57	6,4	0,27	-	-	-	-	22,8	8,37	-
M30	20/6/02	791	36,7	35	-	-	-	-	331,6	7,59	4
P9	4/11/02	782	139,2	53	3,1	13,8	-	-	60,7	8,25	10
M31	5/11/02	702	79,8	64,2	-	15	-	-	449	7,59	5
D12	6/11/02	1925	57,4	28	8,3	17,8	-	-	488,2	6,80	10
M32	20/11/02	301	59,2	50	2,6	4,40	-	-	107,4	7,35	5
D13	20/11/02	1480	61,6	17,8	6,0	18,0	-	-	290	6,88	10
P10	10/12/02	711	38,4	7,50	2,3	2,50	-	-	67,7	7,76	5
D14	10/12/02	1672	94,5	25	9,0	20,2	-	-	414	6,86	20
M33	10/12/02	2733	99,4	74,5	0,0	5,50	-	-	2170	7,36	10
M34	4/4/03	-	-	-	-	-	-	-	-	7,3	5
D15	12/3/03	2920	177,8	27,8	5,7	25	-	-	466,7	6,34	10
L15	14/3/03	9	15,7	0,13	2,3	0,15	-	-	-	7,80	-
L16	>>	10	4,6	0,10	1,2	0,12	-	-	-	8,15	-
L17	>>	9	6,7	0,03	1,8	0,10	-	-	-	8,45	-
L18	>>	13	6,0	0,19	1,9	0,05	-	-	-	8,40	-
L19	>>	11	7,8	0,04	1,5	0,11	-	-	-	8,36	-

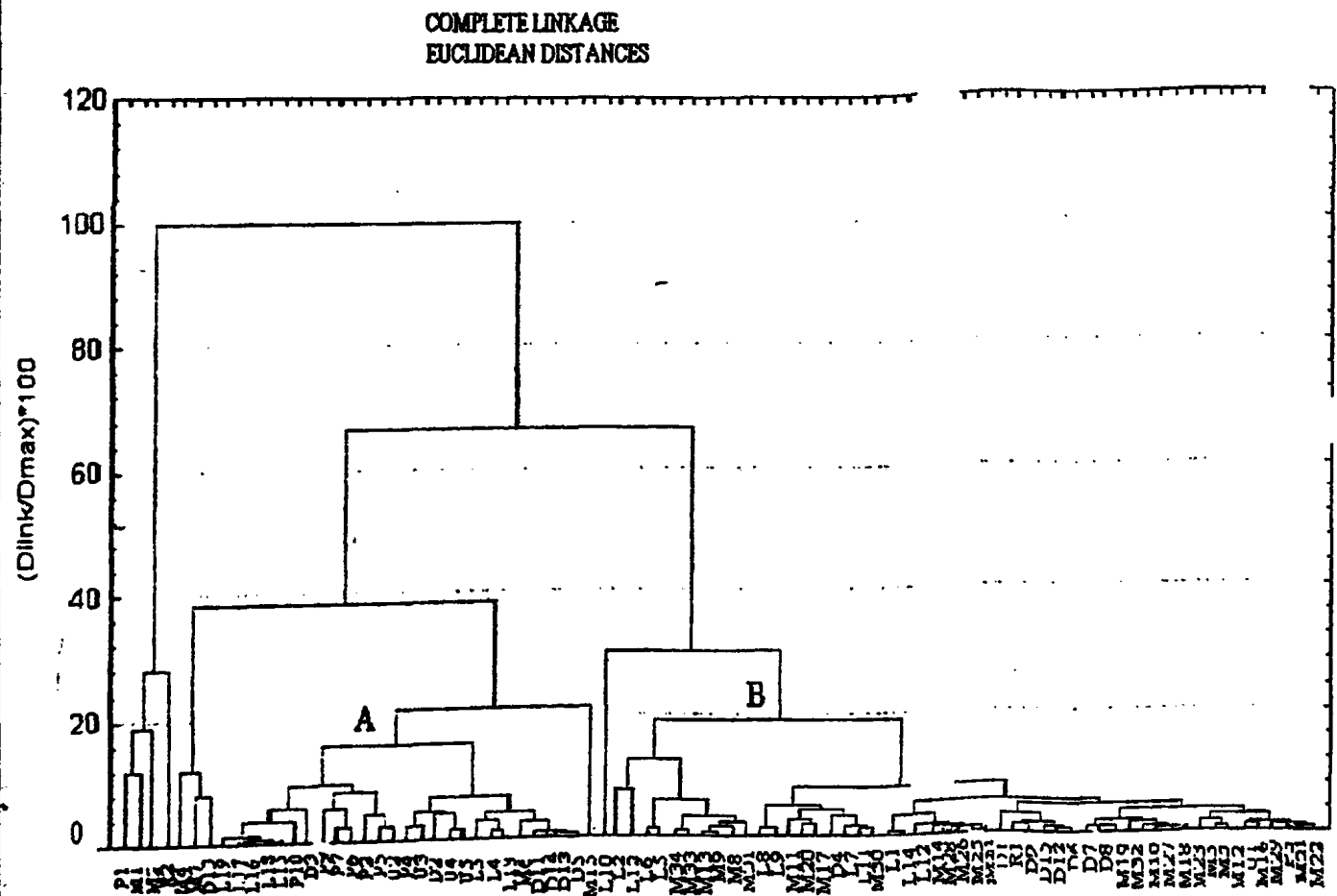
3.1.2 Ανάλυση σε συστάδες

Στο σχήμα 3.1 απεικονίζεται το διάγραμμα που προκύπτει από την εφαρμογή της Ανάλυσης σε συστάδες στα φάσματα των 85 δειγμάτων αποβλήτων και επιφανειακών νερών.

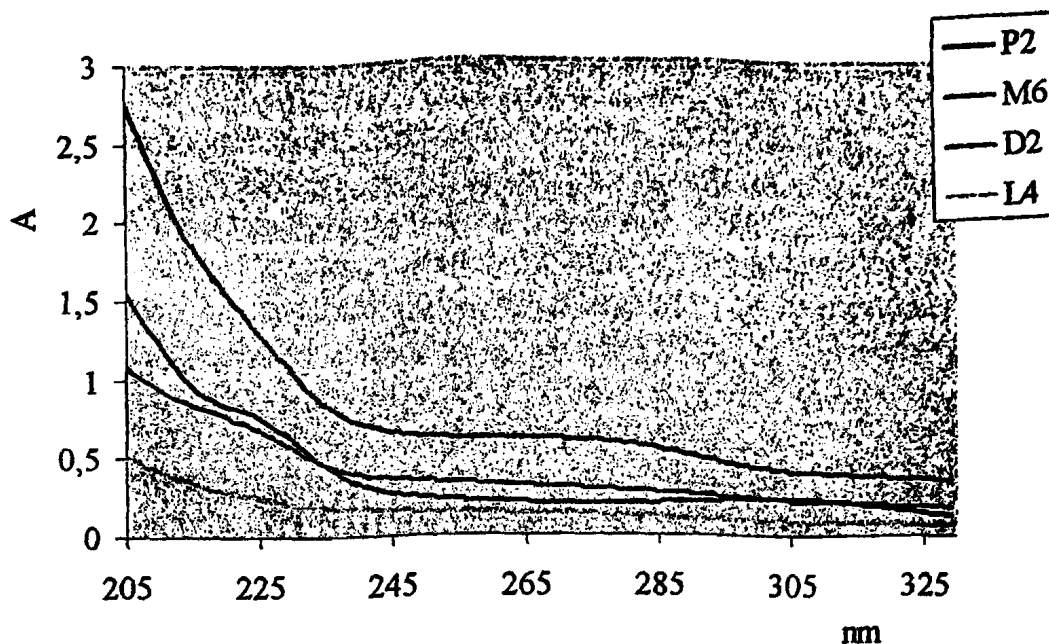
Από το δενδρόγραμμα μπορούμε να ξεχωρίσουμε δύο κύριες ομάδες: τις Α και Β. Η ομάδα Α ξεκινάει από το δείγμα L19 και περιλαμβάνει και το D5. Η ομάδα Β ξεκινάει από το δείγμα L2 και περιλαμβάνει και το δείγμα M22. Στα σχήματα 3.2 και 3.3 δίνονται παραδείγματα φασμάτων από τις δύο ομάδες.

Τα δύο ενδιαμέσα δείγματα M15 και L10 που βρίσκονται μεταξύ των δύο αυτών ομάδων τα παραλείπουμε. Τα αρχικά δείγματα του διαγράμματος από το P1 μέχρι και το D10 διαφέρουν πολύ από τις δύο ομάδες. Οι κατηγορίες δειγμάτων που περιέχει η κάθε μία από τις ομάδες Α και Β περιλαμβάνονται στους πίνακες 2 και 3.





ΣΧΗΜΑ 3.1 : Ανάλυση σε συστάδες των αρχικών δειγμάτων αποβλήτων

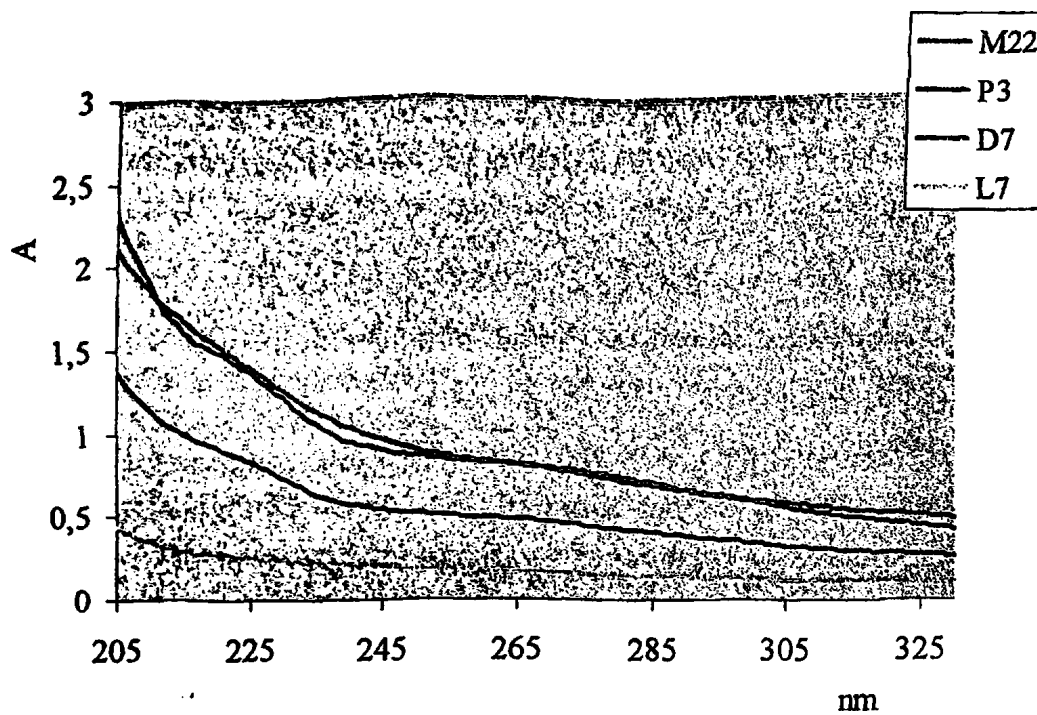


ΣΧΗΜΑ 3.2 : UV φάσματα δειγμάτων που ανήκουν στην ομάδα A

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Δείγματα ομάδας A

Είδος	Αριθμός
Αστικά	1
Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου	4
Δημόσιου Νοσοκομείου	7
Γαλακτοβιομηχανίας	6
Επιφανειακά	8
Σύνολο	26





ΣΧΗΜΑ 3.3 : UV φάσματα δειγμάτων που ανήκουν στην ομάδα Β

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Δείγματα ομάδας Β

Είδος	Αριθμός
Αστικά	28
Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου	1
Δημόσιου Νοσοκομείου	2
Γαλακτοβιομηχανίας	8
Επιφανειακά	11
Σύνολο	50

Από τους παραπάνω πίνακες βλέπουμε ότι η ομάδα Α περιλαμβάνει μόνο ένα δείγμα αστικού λύματος, το Μ6, ενώ όλα τα υπόλοιπα βρίσκονται στην ομάδα Β. Αντίθετα η πλειοψηφία των νοσοκομειακών λυμάτων, περιλαμβάνεται στην ομάδα Α. Λαμβάνοντας υπόψη τις παραμέτρους ποιότητας των δειγμάτων αυτών, βλέπουμε ότι τα δείγματα που ανήκουν στην ομάδα Α έχουν μεγάλη διαφορά στην συγκέντρωση ΤΚΝ από την Ν-NH₄ και ιδίως για τα επιφανειακά, εκτός από τα L3 και L4 που δεν περιέχουν καθόλου ΤΚΝ. Τα νιτρικά δεν φαίνονται να παίζουν κάποιο ρόλο. Τα απόβλητα από το δημόσιο νοσοκομείο έχουν περίπου COD 700-800 mg/L. Από το σχήμα 1 που δείχνει φάσματα δειγμάτων που ανήκουν στην ομάδα Α φαίνεται ότι παρουσιάζουν απορρόφηση στην περιοχή 300-310 nm.

Η ομάδα Β περιέχει κυρίως αστικά λύματα και τρία νοσοκομειακά, τα Ρ8, Ρ3 και U1 (πιθανόν να είχαν μικρότερη συγκέντρωση φαρμάκων και για το λόγο αυτό η εικόνα τους έμοιαζε πιο πολύ με αστικά). Τα λύματα αυτά δεν έχουν αυξημένο πρωτεϊνικό περιεχόμενο σε σχέση με το Ν-NH₄. Τα επιφανειακά νερά της ομάδας αυτής έχουν αυξημένο COD σε σχέση με τα δείγματα της άλλης ομάδας. Άρα δεν παίζουν κανένα ρόλο οι ενώσεις πρωτεϊνικού τύπου στην ομοιότητα των φασμάτων. Από το σχήμα 2 που δείχνει φάσματα δειγμάτων που ανήκουν στην ομάδα Β φαίνεται ότι δεν παρουσιάζουν απορρόφηση στην περιοχή 300-310 nm.

Από τα πρώτα 7 δείγματα του διαγράμματος το D10 έχει μελετηθεί στο κεφάλαιο με την SEC χρωματογραφία (στο φάσμα του κυριαρχούν οι ενώσεις με μικρό ΜΒ). Τα δύο πρώτα δείγματα δηλ. τα Ρ1 και Μ1 έχουν πολλά νιτρικά, ενώ το δείγμα R2 μελετήθηκε με την τεχνική της διαπίδυσης.

Συμπέρασμα

Η μέθοδος αυτή των φασμάτων φαίνεται να διαχωρίζει καλά τα αστικά λύματα από τα νοσοκομειακά απόβλητα. Δεν μπορεί όμως να διακρίνει από τα νοσοκομειακά και τα αστικά, αυτά της λίμνης και της γαλακτοβιομηχανίας.



Ομοιότητες και διαφορές μεταξύ των δειγμάτων που μελετήθηκαν

Τα δείγματα που κλασματώθηκαν με την μέθοδο της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους και της διαπίδυσης όπως θα δούμε σε παρακάτω ενότητες, παρουσιάζουν τις παρακάτω ομοιότητες και διαφορές μεταξύ τους:

- Τα αστικά λύματα που μελετήθηκαν M21, M29 και M20 ανήκουν στην ίδια ομάδα (B) και συνεπώς μοιάζουν πολύ μεταξύ τους.
- Το δείγμα του επιφανειακού νερού λίμνης L14 διαφέρει πάρα πολύ από το δείγμα του νερού του ποταμού. Το πρώτο ανήκει στην ίδια ομάδα (B) με τα αστικά απόβλητα, ενώ το δεύτερο δεν ανήκει σε καμία από τις δύο ομάδες.
- Από τα νοσοκομειακά απόβλητα τα P5 και P7 ανήκουν στην ίδια ομάδα (A), καθώς επίσης και το U4. Εξαιρέση αποτελεί το P3 το οποίο ανήκει στην ίδια ομάδα (B) με τα αστικά λύματα.
- Από τα βιομηχανικά απόβλητα, τα D6 και D8 μοιάζουν επίσης πολύ μεταξύ τους και ανήκουν στην ίδια ομάδα (B) με τα αστικά λύματα που μελετήθηκαν. Το δείγμα D10 είναι τελείως διαφορετικό, αφού δεν ανήκει σε καμία από τις δύο αυτές ομάδες.



3.2 ΦΑΣΜΑΤΑ ΔΙΑΠΙΔΥΣΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΦΑΣΕΙΣ

3.2.1 Διαπίδυση ενώσεων αναφοράς

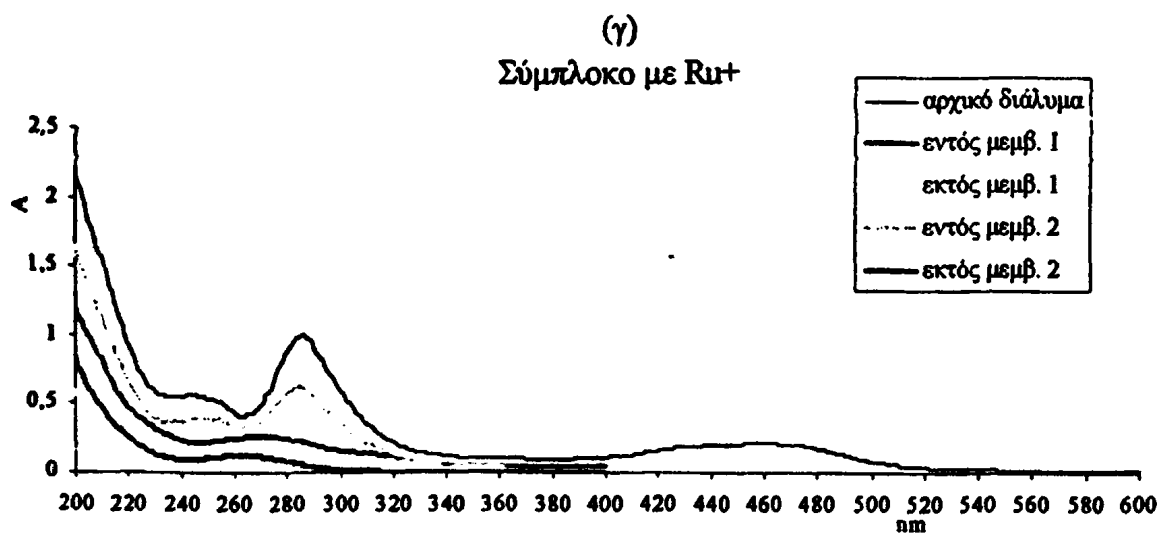
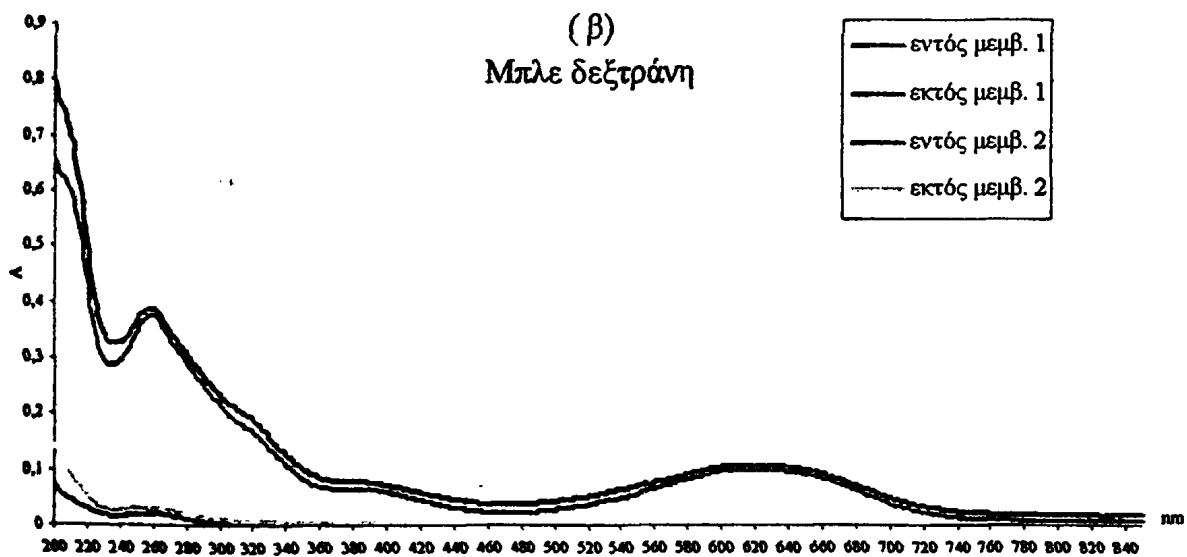
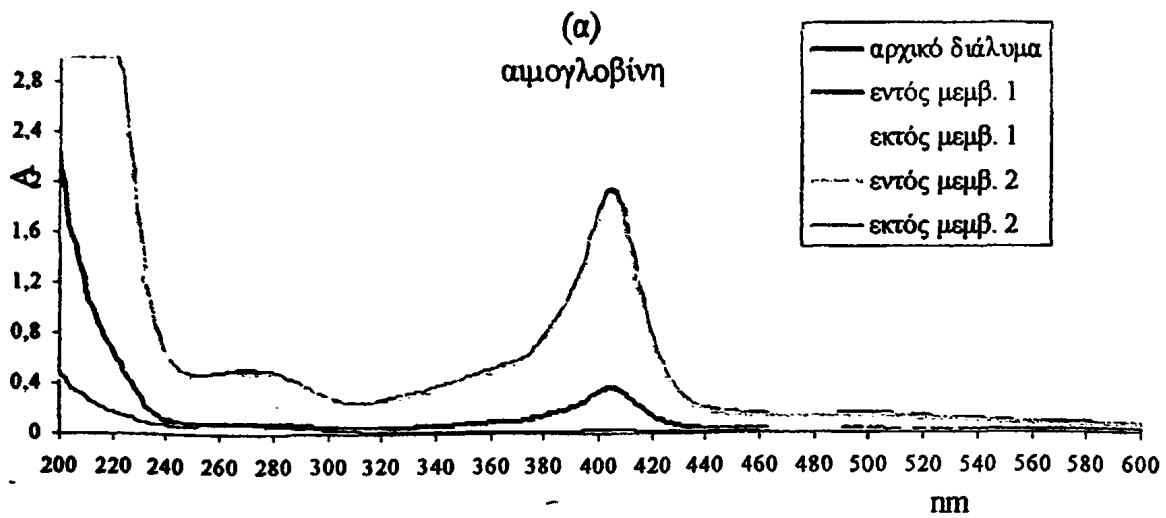
1. Αιμογλοβίνη. Η πρωτεΐνη αυτή όπως φαίνεται στο σχήμα 3.4 (α), έχει αποκτήσει αυξημένη απορρόφηση στο διάλυμα που παρέμεινε εντός και των δύο μεμβρανών, πιθανώς λόγω καθαρισμού (αφαλάτωση) της πρωτεΐνης. Στο εξωτερικό και των δύο μεμβρανών παίρνουμε πάλι φάσμα αλλά με ελάχιστη απορρόφηση. Στο σχήμα 3.4 δίνονται τα φάσματα που έχουν ληφθεί.

2. Κυανή δεξτράνη. Παρατηρούμε από το σχήμα 3.4 (β) ότι η ένωση αυτή παραμένει και στις δύο μεμβράνες στο εσωτερικό τους, όπως είναι αναμενόμενο αφού έχει πολύ υψηλό MB σε σχέση με τα όρια αποκλεισμού των μεμβρανών (MWCO). Στο εξωτερικό διάλυμα βλέπουμε πάλι φάσμα αλλά με ελάχιστη απορρόφηση. Το φάσμα αυτό φέρει έναν ώμο στην περιοχή 265-270 nm.

3. Σύμπλοκο με ρουθίνιο. Από το σχήμα 3.4 (γ) παρατηρούμε ότι στη μεμβράνη από αναγεννημένη κυτταρίνη από την οποία πρέπει να περάσει το σύμπλοκο αυτό προσροφάται πλήρως (είναι θετικά φορτισμένη ένωση), ενώ στη μεμβράνη από εστέρα κυτταρίνης παρέμεινε όπως αναμένεται, ενώ μειώνεται η συγκέντρωσή του. Στο εξωτερικό και των δύο μεμβρανών βλέπουμε επίσης φάσμα.

Η αύξηση της απορρόφησης των ενώσεων αναφοράς (αιμογλοβίνη) στο διάλυμα που παραμένει εντός των μεμβρανών μπορεί να οφείλεται: (α) στην διάσταση των όξινων ή βασικών ομάδων μετά τη διαπίδυση των αλάτων, (β) στην ύπαρξη προσμίξεων στα εσωτερικά τοιχώματα της μεμβράνης που δεν έφυγαν με την προκατεργασία της, (γ) στην πιθανότητα ανάπτυξης αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων της πρωτεΐνης αλλά και άλλων που συνυπάρχουν (λίγο απίθανο). Αντίθετα, στην περίπτωση του συμπλόκου που δεν παρατηρείται διαπίδυση (μειωμένη απορρόφηση στο εκτός της μεμβράνης διάλυμα) πιθανό να οφείλεται (α) στην προσρόφηση του συμπλόκου από το μεμβρανικό υλικό ή (β) στη διάσπαση του συμπλόκου λόγω αστάθειάς του στο εξωτερικό της μεμβράνης διάλυμα.

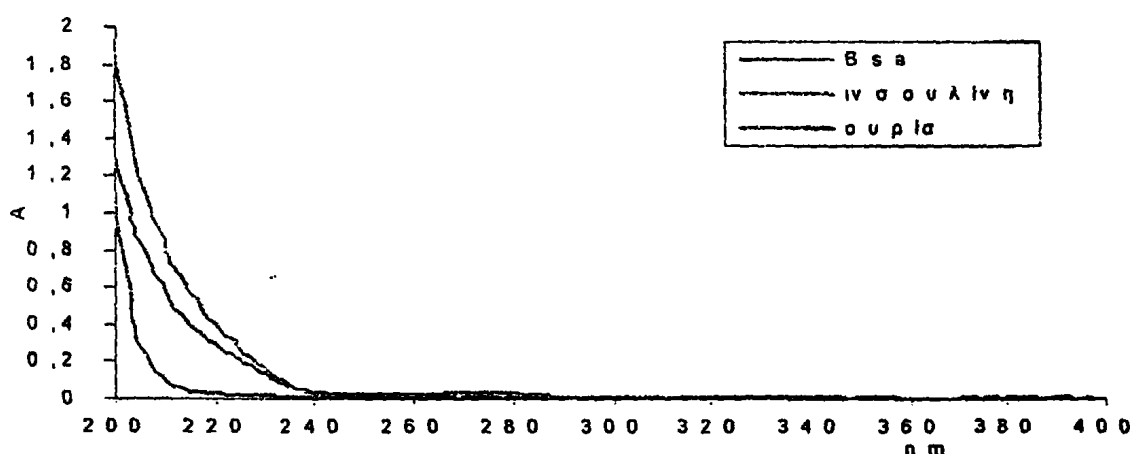




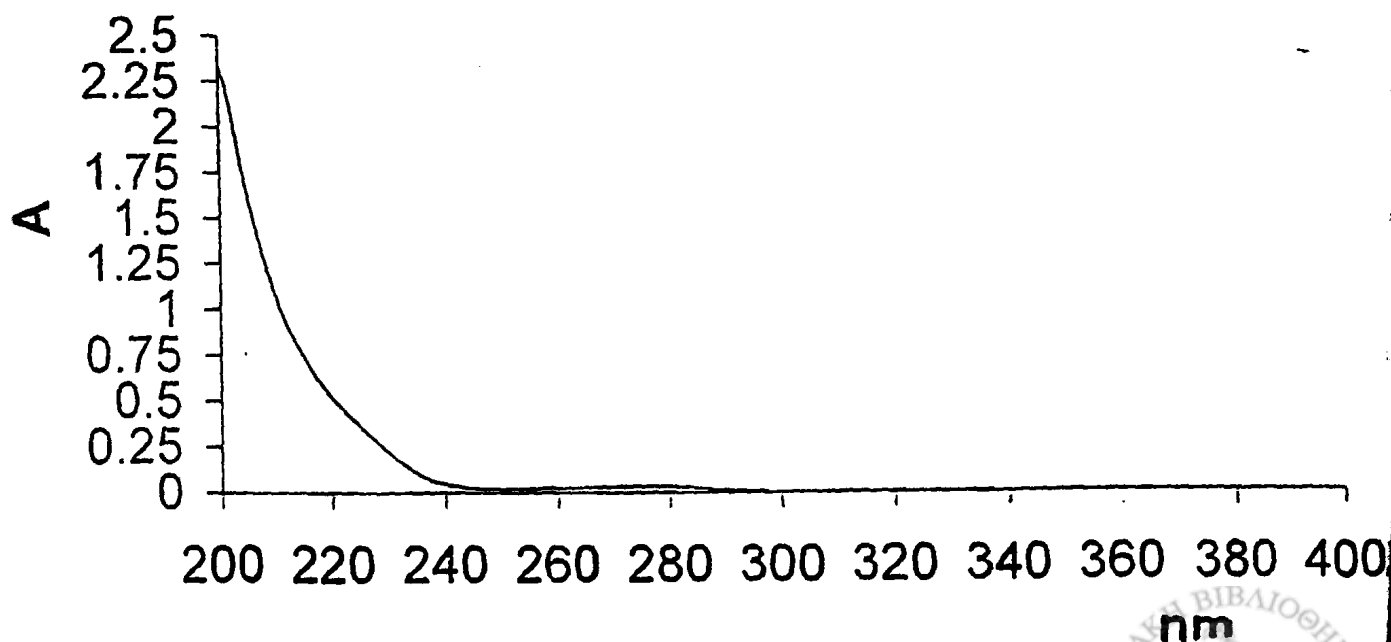
ΣΧΗΜΑ 3.4: UV φάσματα της αιμογλοβίνης, κυανής δεξτράνης, του συμπλόκου Ru και των κλασμάτων τους με τη μέθοδο της διαπίδυσης



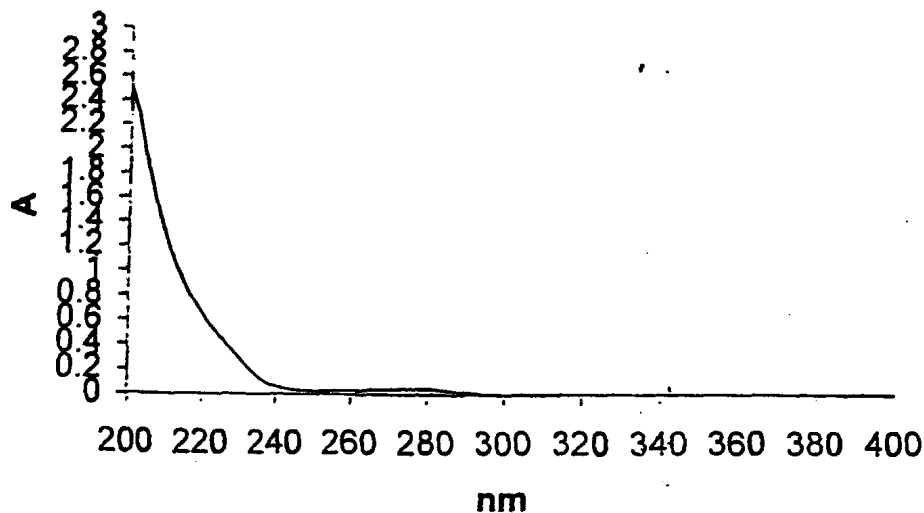
4. μίγμα τριών ενώσεων πεπτιδικής φύσεως: BSA, ινσουλίνη και ουρία με συγκεντρώσεις αντίστοιχα 0,028, 0,012 και 0,582 mg/ml στο διάλυμα. Τα φάσματα των ενώσεων αυτών δίνονται στο σχήμα 3.5. Όπως φαίνεται από το σχήμα αυτό το φάσμα της ουρίας διαφοροποιείται (περιορίζεται στην περιοχή 200-220 nm), ενώ στις άλλες δύο ενώσεις αναφοράς δεν έχουμε σημαντικές διαφοροποιήσεις. Το φάσμα του μίγματος των τριών ενώσεων δίνεται στο σχήμα 3.6. Επίσης, δίνεται το φάσμα του διαλύματος που περιέχει BSA (0,028 mg/ml) και ινσουλίνη (0,012 mg/ml) και το φάσμα του διαλύματος που περιέχει ινσουλίνη (0,012 mg/ml) και ουρία (0,582 mg/ml) στα σχήματα 3.7 και 3.8, αντίστοιχα.



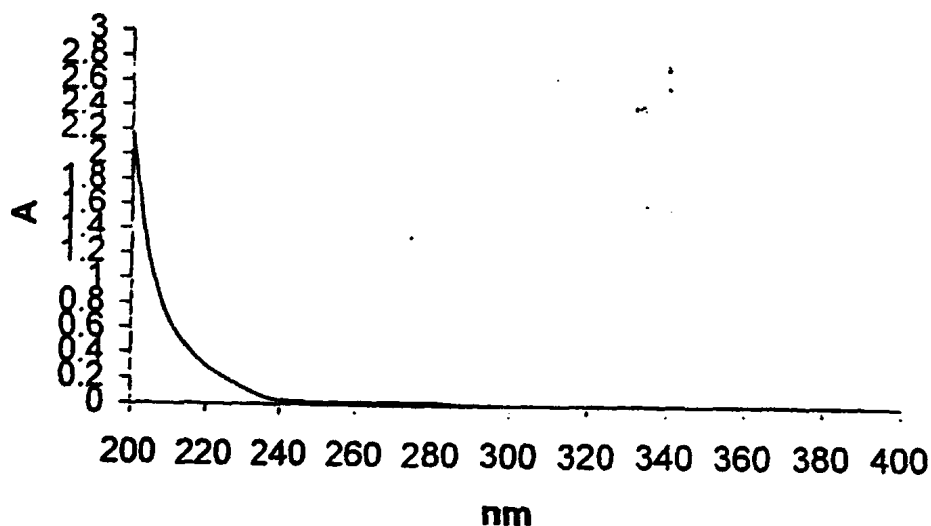
ΣΧΗΜΑ 3.5: UV φάσματα διαλύματος Bsa (0,028 mg/ml), διαλύματος ινσουλίνης (0,012 mg/ml) και διαλύματος ουρίας (0,582 mg/ml)



ΣΧΗΜΑ 3.6: UV φάσμα του μίγματος των τριών ενώσεων (Bsa, ινσουλίνη και ουρία)



ΣΧΗΜΑ 3.7: UV φάσμα του μίγματος Bsa (0,028 mg/ml) και ινσουλίνης (0,012 mg/ml)



ΣΧΗΜΑ 3.8: UV φάσμα του μίγματος ινσουλίνης (0,012 mg/ml) και ουρίας (0,582 mg/ml)

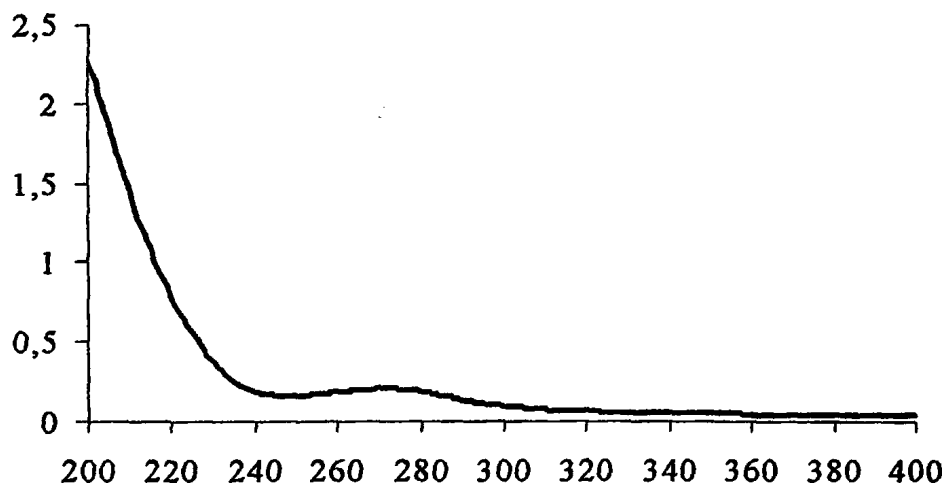
Για να ερμηνεύσουμε τα αποτελέσματα θεωρούμε ότι η ένωση που έχει MB μικρότερο από το όριο αποκλεισμού της μεμβράνης διαπερνάει την μεμβράνη και ότι υπάρχει ισορροπία μεταξύ των δύο φάσεων.

- Όταν το μίγμα των τριών ενώσεων εισάγεται προς διαπίδυση στην μεμβράνη 1 από την οποία πρέπει να περάσουν οι δύο τελευταίες ενώσεις, παρατηρούμε από το σχήμα 3.9, τα εξής:

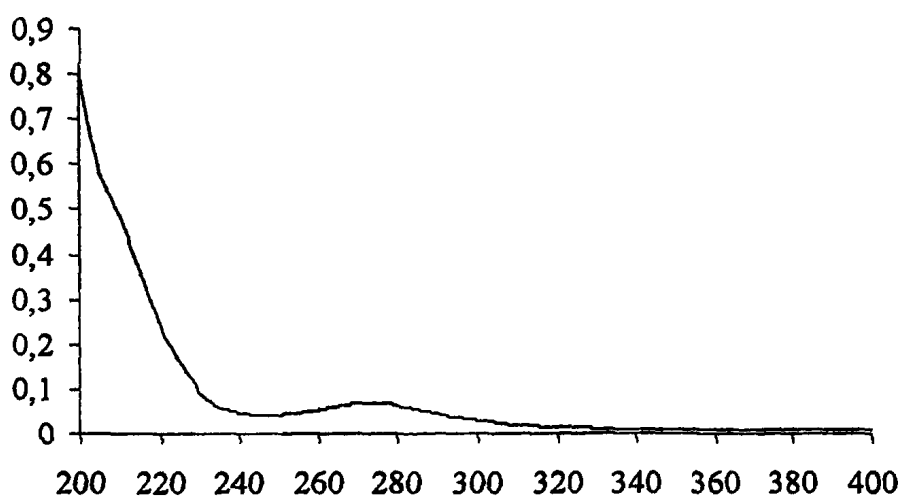


Στο εσωτερικό της μεμβράνης, όπου αναμένουμε όλη την ποσότητα της πρωτεΐνης και ελαττωμένη ποσότητα των άλλων δύο, βλέπουμε ότι παίρνουμε φάσμα σαν αυτό που αναμένουμε. Στο εξωτερικό της μεμβράνης όπου πρέπει να έχουμε την υπόλοιπη ποσότητα των άλλων δύο, παίρνουμε ένα φάσμα αρκετά μικρότερο από το αναμενόμενο. Αυτό πιθανόν οφείλεται σε χαμηλή ανάκτηση σε ινσουλίνη.

εσωτερικό της 1ης μεμβράνης



εξωτερικό της 1ης μεμβράνης

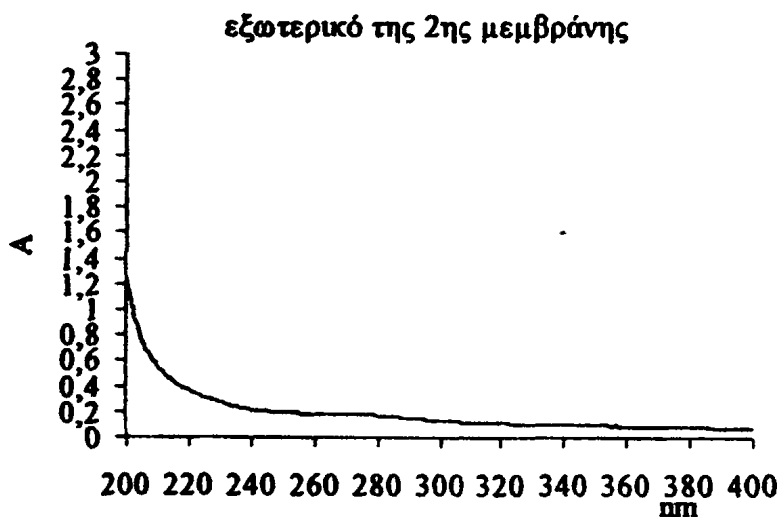
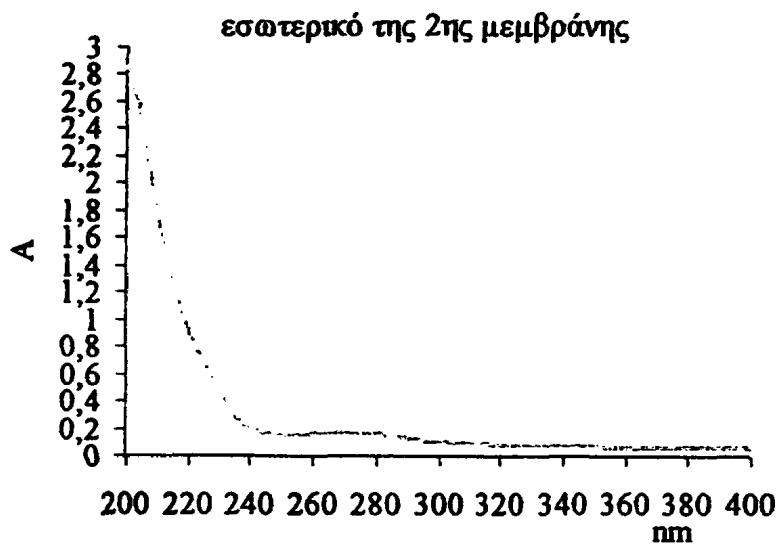


ΣΧΗΜΑ 3.9: Μίγμα των τριών ενώσεων στη μεμβράνη διαπίδυσης με MWCO 12000



- Όταν το μίγμα εισαχθεί προς διαπίδυση στη μεμβράνη 2 από την οποία πρέπει να περάσει μόνο η ουρία, παρατηρούμε από το σχήμα 3.10, ότι:

Στο εσωτερικό της μεμβράνης που πρέπει να παραμείνουν οι δύο ενώσεις μαζί με μικρή ποσότητα ουρίας, φαίνεται ότι αυτό συμβαίνει αφού η απορρόφηση είναι σχεδόν ίδια. Έχουμε μία ελαφρά μεταβολή στο φάσμα τους. Στο εξωτερικό της μεμβράνης όπου αναμένουμε την μεγαλύτερη ποσότητα της ουρίας, παίρνουμε ένα φάσμα σχετικά αυξημένο. Αυτό πιθανόν οφείλεται είτε σε υπολειμματικές ενώσεις από την μεμβράνη είτε στα άλατα που χρησιμοποιούνται ως αντισταθμιστικά ιόντα



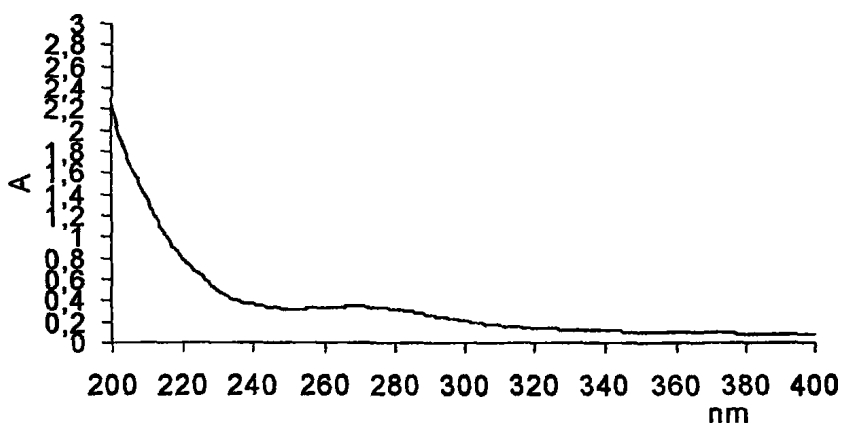
ΣΧΗΜΑ 3.10: Μίγμα των τριών ενώσεων στη μεμβράνη διαπίδυσης με MWCO 500



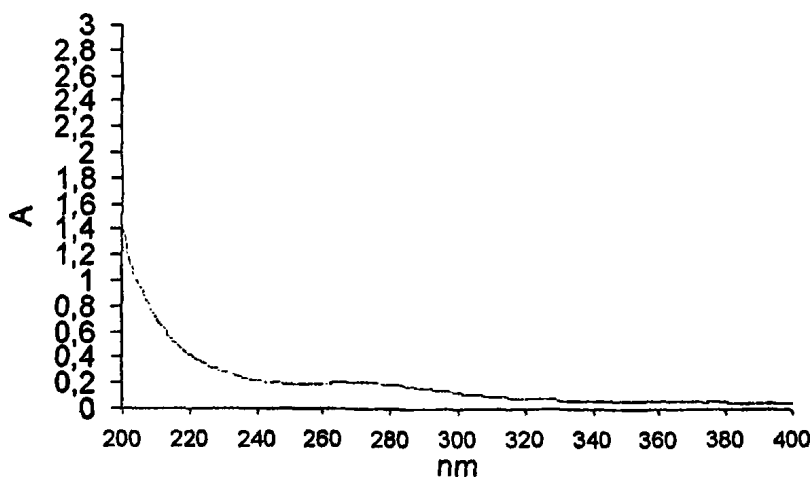
- Όταν τέλος, το εξωτερικό περιεχόμενο από τη μεμβράνη 1 (που κανονικά πρέπει να περιέχει την μεγαλύτερη ποσότητα ινσουλίνης και μικρή ποσότητα της ουρίας μαζί με άλατα) το εισάγουμε προς διαπίδυση στη μεμβράνη 2 (σχήμα 3.11), παρατηρούμε ότι:

Στο εσωτερικό της μεμβράνης όπου αναμένουμε την μεγάλη ποσότητα της ινσουλίνης μαζί με πολύ μικρή ποσότητα της συνολικής ουρίας συμβαίνει πιθανόν αφαλάτωση της ινσουλίνης. Το φάσμα στο εξωτερικό της μεμβράνης πιθανόν να οφείλεται σε υπολειμματικές ενώσεις από την μεμβράνη είτε στα άλατα που χρησιμοποιούνται ως αντισταθμιστικά ιόντα

το εξωτερικό της 1ης στο εσωτερικό της 2ης



το εξωτερικό της 2ης μεμβράνης



ΣΧΗΜΑ 3.11: Μίγμα των δύο ενώσεων στη μεμβράνη διαπίδυσης με MWCO 500



Λαμβάνοντας υπόψη τα εξής: α) ότι οι κυτταρικές μεμβράνες έχουν παραμορφωμένο πολυμερικό δίκτυο και ότι δεν είναι πλήρως ομοιογενείς στην επιφάνειά τους, β) ότι μπορεί να συμβαίνει καταβύθιση των πρωτεϊνών, γ) ότι μπορεί να υπάρχουν υπολειμματικές ενώσεις από τις μεμβράνες που μπορεί να απορροφούν, και δ) ότι τα αντισταθμιστικά άλατα μπορεί να δώσουν φάσμα αυξάνοντας τη γραμμή βάσης (baseline), οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι είναι δύσκολη η ερμηνεία των αποτελεσμάτων που έχουν ληφθεί για τις ενώσεις αναφοράς με την μέθοδο της διαπίδυσης.

Συμπερασματικά από την μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι τα μίγματα ουσιών που υφίστανται τη διεργασία της διαπίδυσης μέσω των μεμβρανών αυτών και παραμένουν εντός των μεμβρανών δίνουν φάσματα που ανάλογα με το είδος τους περιέχουν αυξημένες απορροφήσεις (αιμογλοβίνη) όταν χάνουν τα αντισταθμιστικά τους ιόντα ή να εμφανίζουν φαινόμενα αλληλεπίδρασης με το μεμβρανικό υλικό και να παγιδεύονται (σύμπλοκο) οπότε το φάσμα διαφοροποιείται σε ένταση. Παρ' όλα αυτά στις πλείστες περιπτώσεις των χημικώς σταθερών ενώσεων διατηρούν τα φασματικά χαρακτηριστικά των σωματιδιακών μορφών που απορροφούν, όταν οι υπόλοιπες μορφές τους δεν απορροφούν και διαφοροποιούνται, όταν η αναλογία τους διαφοροποιηθεί.



3.2.2 Διαπίδυση δειγμάτων

Ι) Αστικά απόβλητα

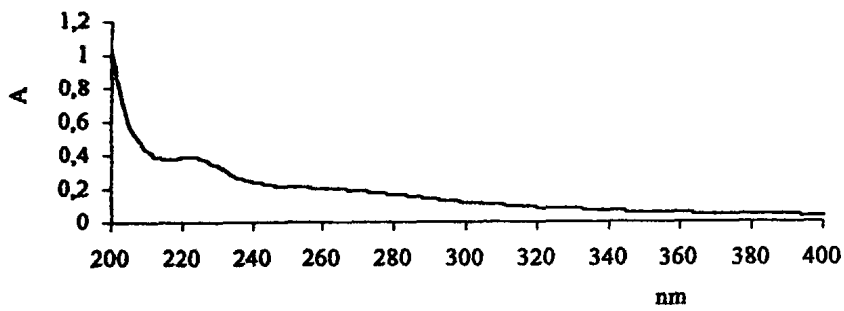
Το πρώτο δείγμα M20 έχει φάσμα χαρακτηριστικό με πολύ έντονο ώμο στα 225-230 nm, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.12. Τα UV φάσματα των κλασμάτων που παίρνουμε από το δείγμα αυτό δίνονται στο ίδιο σχήμα.

Όταν το δείγμα αυτό εισαχθεί προς διαπίδυση στην μεμβράνη 1, βλέπουμε τις ενώσεις που παραμένουν στο εσωτερικό της να έχουν φάσμα παρόμοιο με το αρχικό καθώς και με το φάσμα του εξωτερικού διαλύματος. Επειδή ο ώμος ενισχύεται στο εξωτερικό διάλυμα, συμπεραίνουμε ότι οι ενώσεις αυτές έχουν $MB < 12000$.

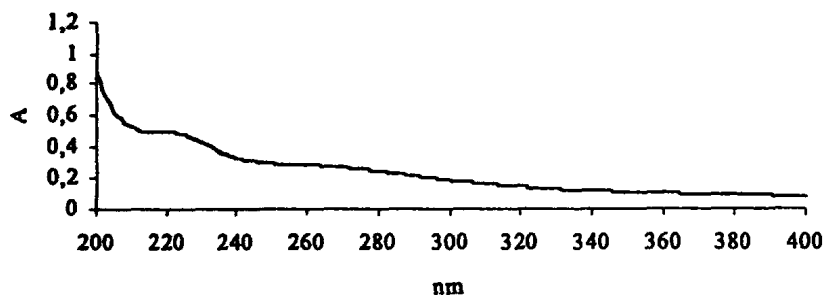
Όταν οι ενώσεις με $MB < 12000$ εισαχθούν στην μεμβράνη 2, παραμένουν όλες στο εσωτερικό της μεμβράνης, δείχνοντας ότι όλες οι ενώσεις που έχουν $MB < 12000$ και απορροφούν στην περιοχή 200-400 nm έχουν και $MB > 500$.



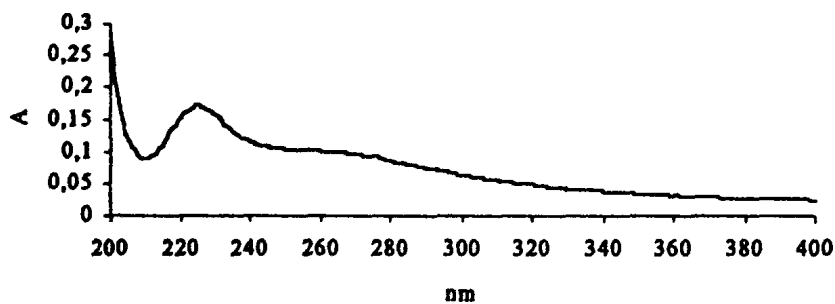
δείγμα M20



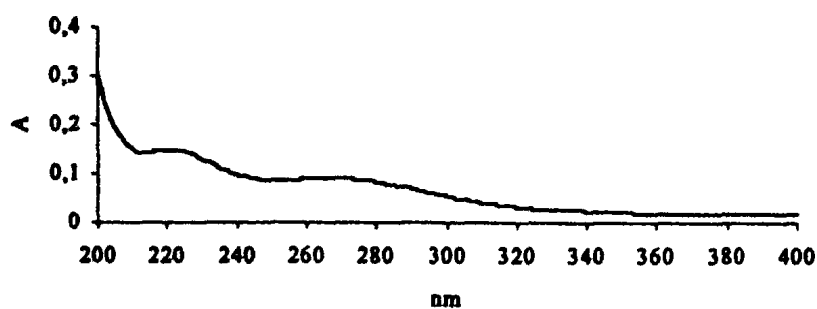
MB>12000
(εντός μεμβράνης)



MB<12000
(εκτός μεμβράνης)



12000>MB>500
(εντός μεμβράνης)



ΣΧΗΜΑ 3.12: UV φάσματα του M20 και των κλασμάτων του



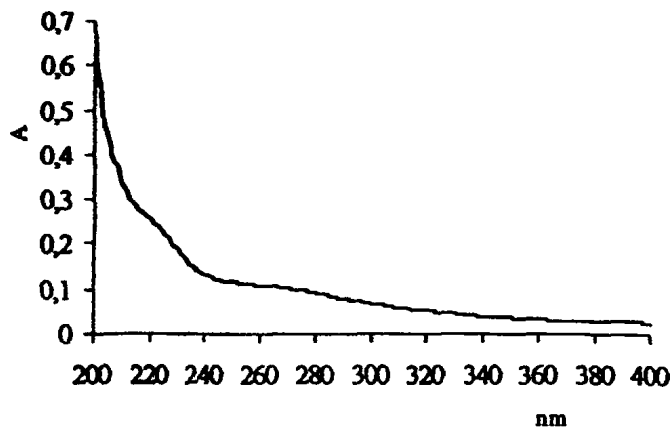
Το δείγμα M21 όπως φαίνεται στο σχήμα 3.13 έχει έναν πολύ ελαφρύ ώμο στα 225-230 nm. Τα UV φάσματα από τα κλάσματα που παίρνουμε από το δείγμα αυτό δίνονται στο ίδιο σχήμα.

Όταν εισαχθεί στην μεμβράνη 1, δείχνει ότι οι ενώσεις στο εσωτερικό έχουν παρόμοιο φάσμα με το διάλυμα στο εξωτερικό της μεμβράνης. Δεν φαίνεται να φέρουν τον ώμο στα 225-230 nm του αρχικού δείγματος. Ίσως, βρίσκονται σε πολύ μικρό ποσοστό οι ενώσεις εκείνες που φέρουν τον ώμο στο φάσμα τους.

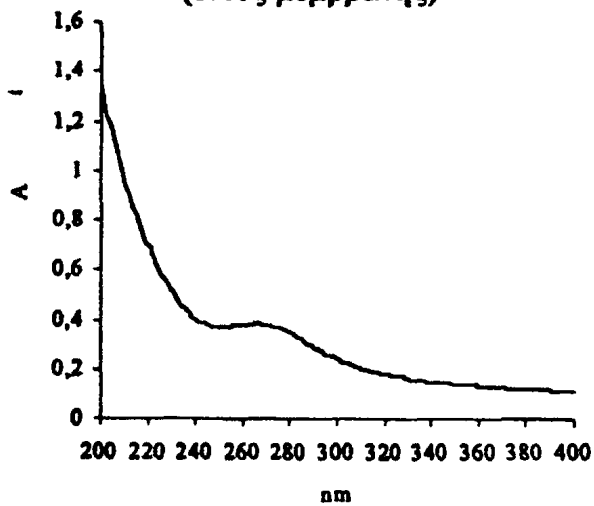
Όταν οι ενώσεις με $MB < 12000$ εισαχθούν στην μεμβράνη 2, τότε παρατηρείται ότι το παραμένον εντός της μεμβράνης διάλυμα έχει φάσμα με έναν μικρό ώμο στα 225-230 nm με έντονη αύξηση της απορρόφησης από τα 260 nm και μετά, ενώ οι ενώσεις που περνούν στο εκτός της μεμβράνης διάλυμα δίνουν ένα τελείως διαφορετικό φάσμα. Ο ώμος εξαφανίζεται τελείως στις ενώσεις με $MB < 500$.



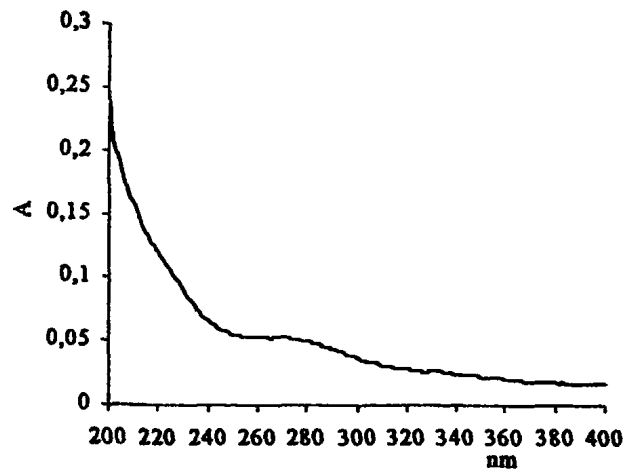
δείγμα M21



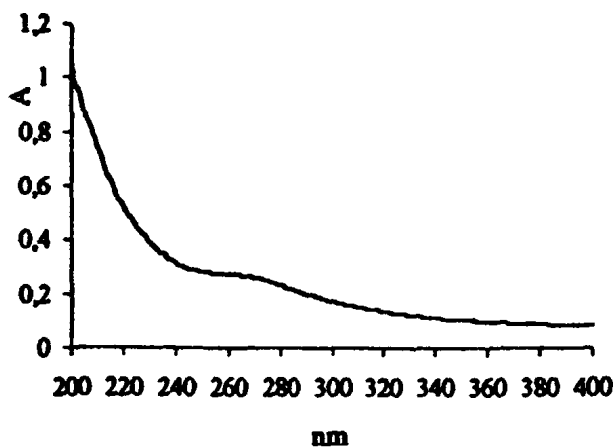
**MB>12000
(εντός μεμβράνης)**



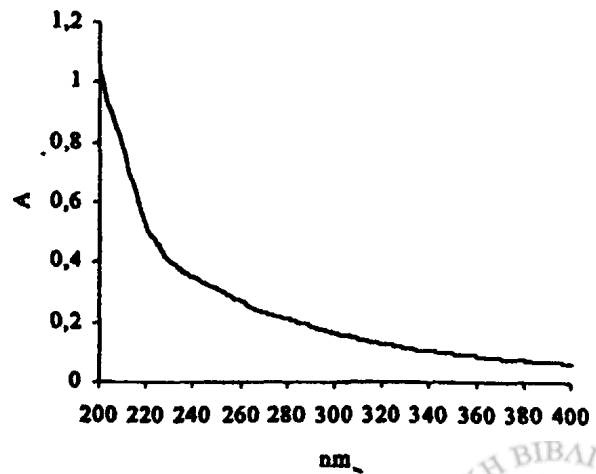
**MB<12000
(εκτός μεμβράνης)**



**12000>MB>500
(εντός μεμβράνης)**



**MB<500
(εκτός μεμβράνης)**



ΣΧΗΜΑ 3.13: UV φάσματα του M21 και των κλασμάτων του



II) Νοσοκομειακά απόβλητα

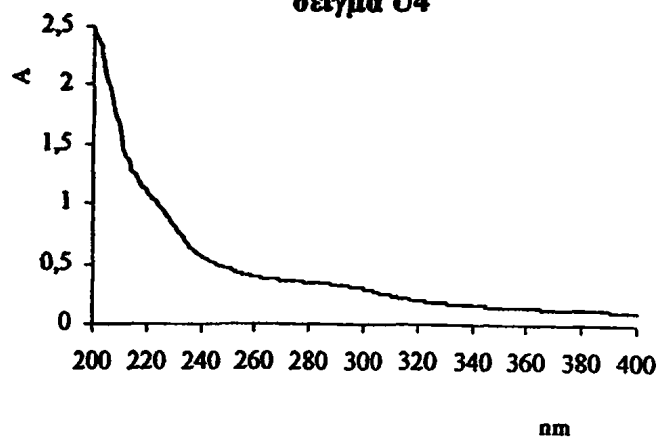
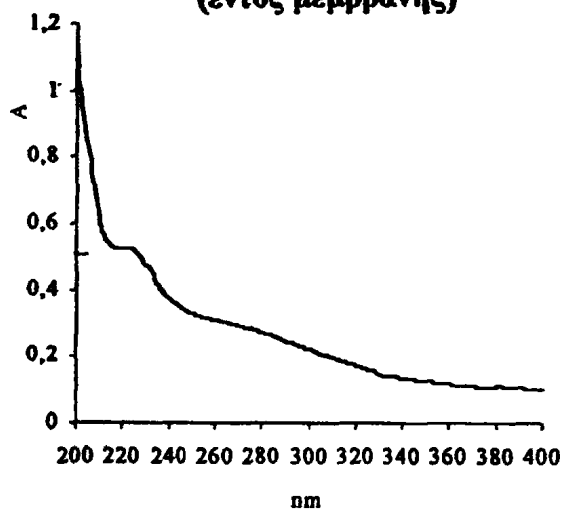
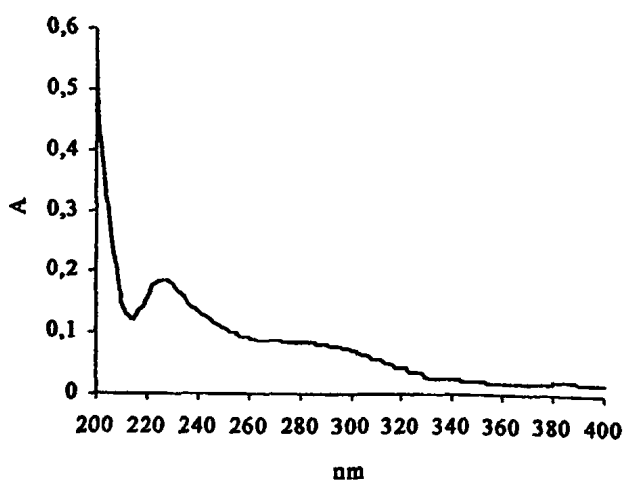
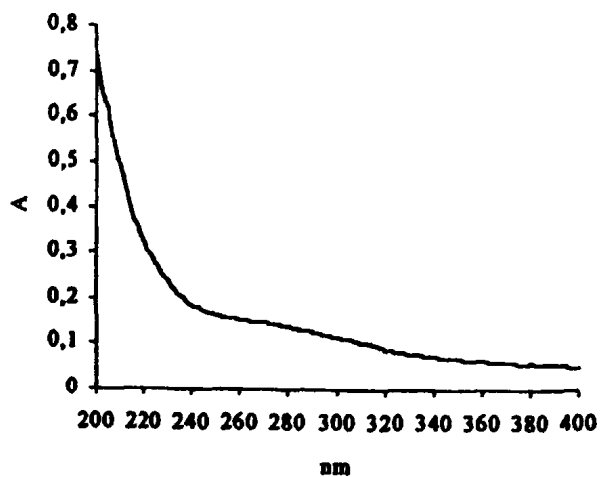
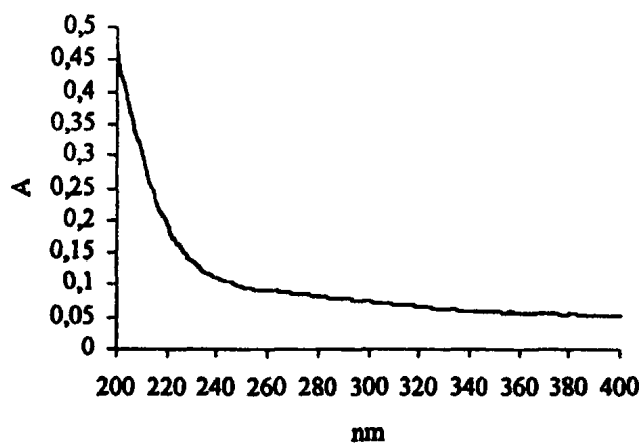
Το δείγμα U4 που προέρχεται από Πανεπιστημιακό νοσοκομείο, παρουσιάζει έναν ελαφρύ ώμο στα 225-230 nm, όπως επίσης και στα 290-300 nm (σχήμα 3.14). Τα UV φάσματα από τα κλάσματα που παίρνουμε από το δείγμα αυτό δίνονται στο ίδιο σχήμα.

Όταν το δείγμα εισαχθεί στην μεμβράνη 1, δείχνει ότι οι ενώσεις με $MB < 12000$ στο εξωτερικό της μεμβράνης έχουν φάσμα με έντονο ώμο στα 225-230 nm, όπως επίσης και στα 290-300 nm. Στο εσωτερικό της, οι ενώσεις δίνουν επίσης φάσμα με λιγότερο έντονο ώμο στα 225-230 nm.

Όταν οι ενώσεις με $MB < 12000$ εισαχθούν στην μεμβράνη 2, όσες παραμένουν στο εσωτερικό της έχουν φάσμα με ώμο στα 290-300 nm, ενώ όσες βγουν εκτός που έχουν $MB < 500$, δίνουν φάσμα χωρίς κάποιο χαρακτηριστικό.



δείγμα U4

MB > 12000
(εντός μεμβράνης)MB < 12000
(εκτός μεμβράνης)12000 > MB > 500
(εντός μεμβράνης)MB < 500
(εκτός μεμβράνης)

ΣΧΗΜΑ 3.14: UV φάσματα του U4 και των κλασμάτων του



Το δείγμα P3 από δημόσιο νοσοκομείο εμφανίζει έντονο ώμο στα 225-230 nm, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.15. Τα UV φάσματα των κλασμάτων του δείγματος αυτού δίνονται επίσης στο σχήμα 3.15.

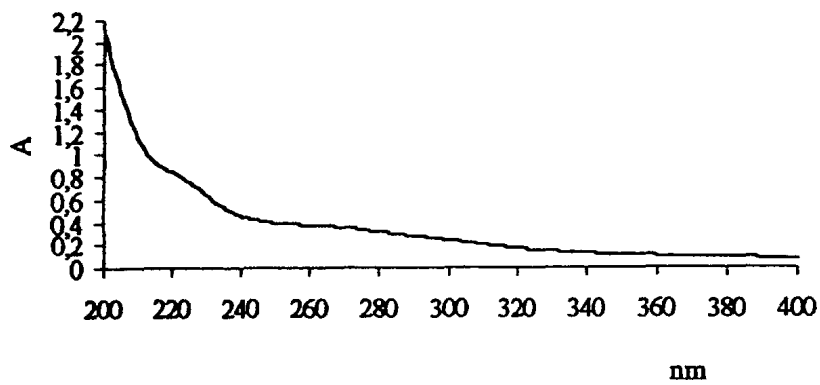
Όταν το δείγμα εισαχθεί στη μεμβράνη 1, δείχνει ότι οι ενώσεις στο εξωτερικό της μεμβράνης με $MB < 12000$ έχουν παρόμοιο φάσμα με το αρχικό (τύπου III, σελ 26). Οι ενώσεις που παραμένουν στο εσωτερικό δίνουν και αυτές παρόμοιο φάσμα.

Όταν οι ενώσεις με $MB < 12000$, εισαχθούν στη μεμβράνη 2, παρατηρείται μία αλλαγή του φάσματός τους με τον ώμο να χάνεται, ενώ εκτός της μεμβράνης δεν υπάρχουν ενώσεις.

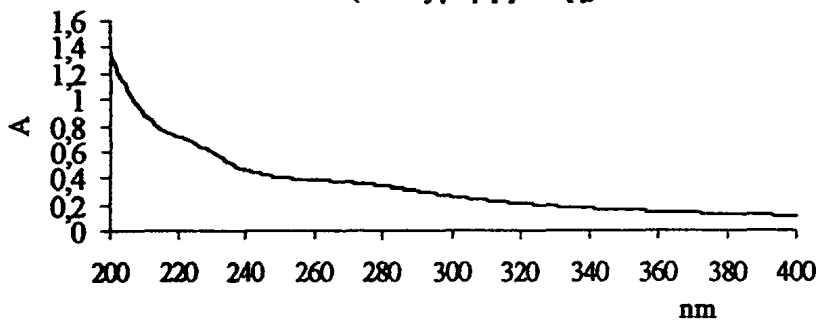
Συμπερασματικά, οι ενώσεις του δείγματος αυτού έχουν $12000 > MB > 500$, και κατά τη διαπίδυση από τη μεμβράνη 2, το φάσμα τους μεταβάλλεται πιθανώς λόγω διαφορετικών συνθηκών.



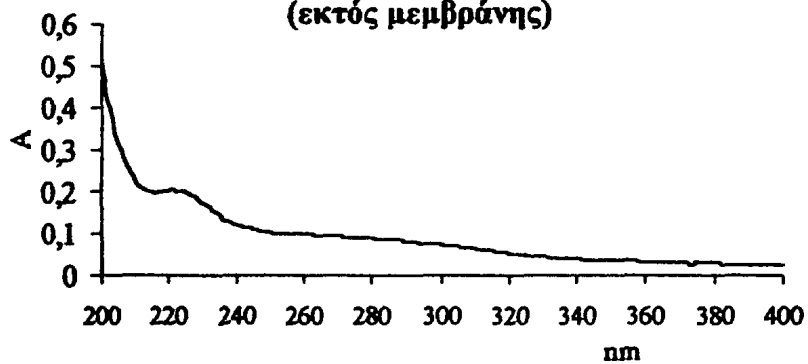
δείγμα P3



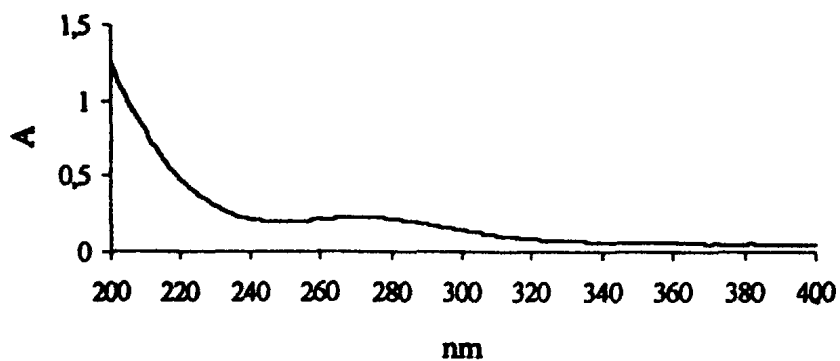
**MB>12000
(εντός μεμβράνης)**



**MB<12000
(εκτός μεμβράνης)**



**12000>MB>500
(εντός μεμβράνης)**



ΣΧΗΜΑ 3.15: UV φάσματα του P3 και των κλασμάτων του



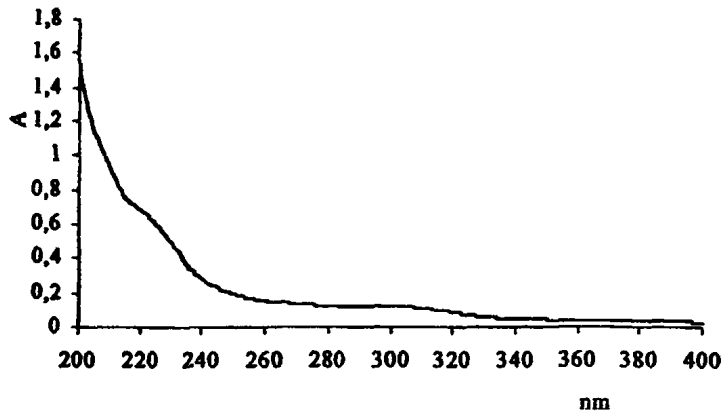
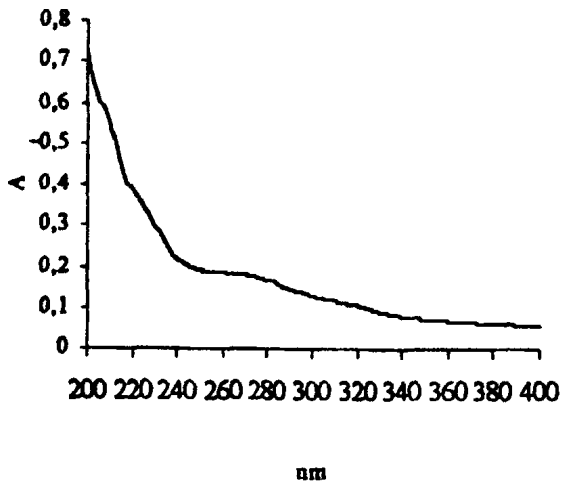
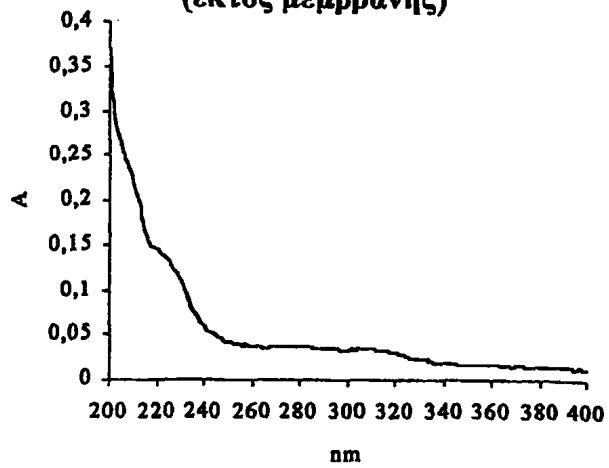
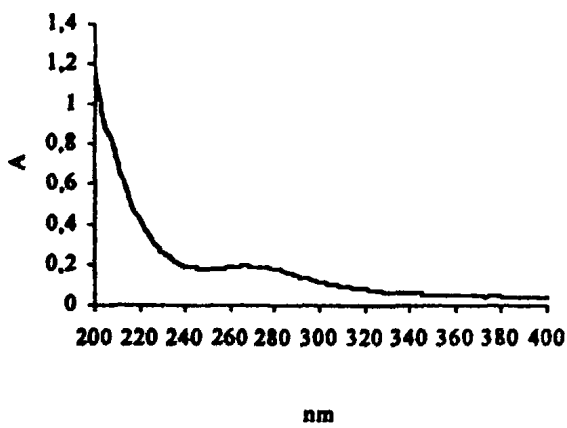
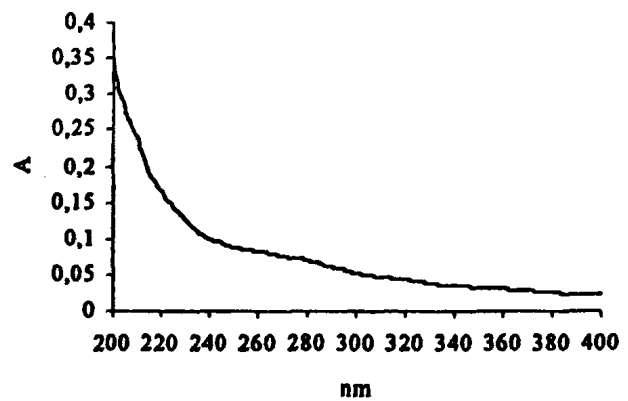
Το δείγμα P5 έχει φάσμα με τρεις ώμους, στα 205-210 nm, στα 220-240 nm και στα 290-300 nm (σχήμα 3.16). Τα UV φάσματα των κλασμάτων του δείγματος αυτού δίνονται επίσης στο σχήμα 3.16.

Όταν το δείγμα εισαχθεί στη μεμβράνη 1, φαίνεται ότι οι ενώσεις με $MB < 12000$ έχουν φάσμα παρόμοιο με το αρχικό, δηλαδή με τους τρεις ώμους, ενώ αυτές που παραμένουν στο εσωτερικό της μεμβράνης εμφανίζουν τους δύο πρώτους ώμους.

Όταν οι ενώσεις με $MB < 12000$ εισαχθούν στη μεμβράνη 2, αυτές που έχουν $MB < 500$, δίνουν φάσμα χωρίς τον ώμο στα 205-210 nm, ενώ στο εσωτερικό οι ενώσεις που παραμένουν, δίνουν φάσμα με ώμο στα 280 nm.



δείγμα P5


MB > 12000
 (εντός μεμβράνης)

MB < 12000
 (εκτός μεμβράνης)

12000 < MB < 500
 (εντός μεμβράνης)

MB < 500
 (εκτός μεμβράνης)

ΣΧΗΜΑ 3.16 : UV φάσματα του P5 και των κλασμάτων του


III) Βιομηχανικά απόβλητα

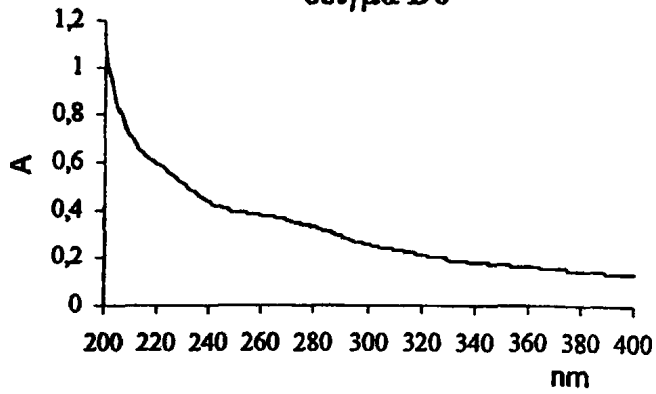
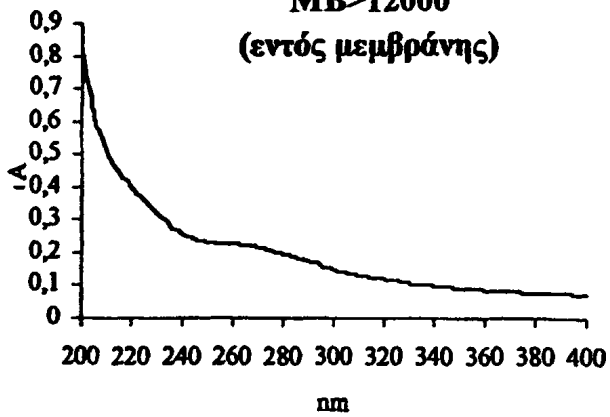
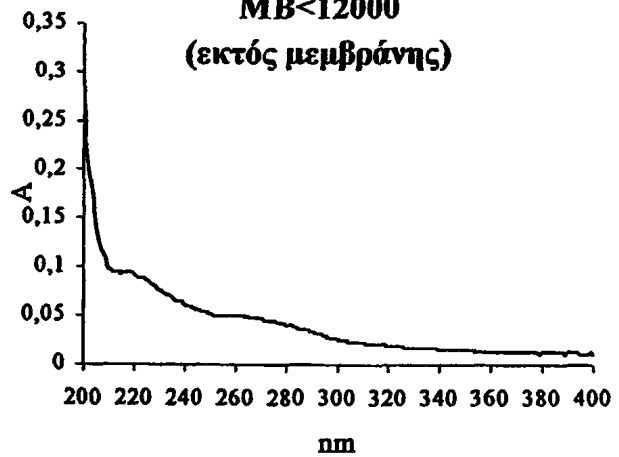
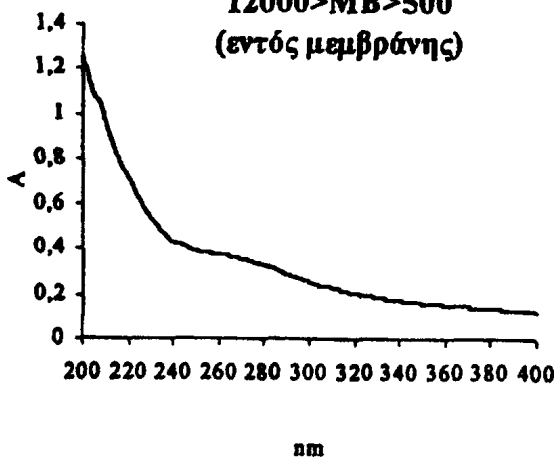
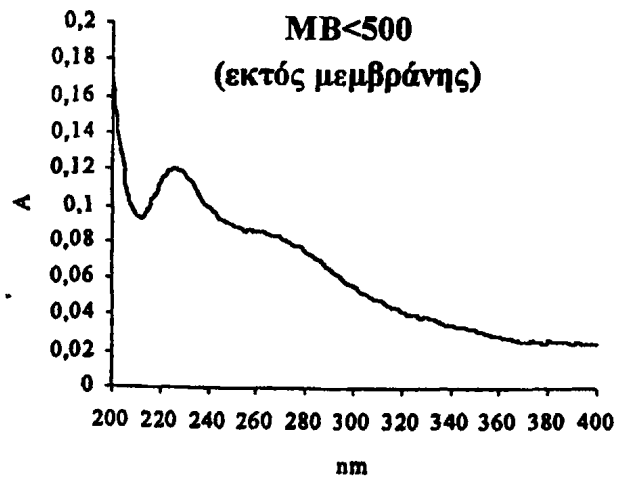
Το δείγμα D6, όπως φαίνεται από το σχήμα 3.17, δείχνει αυξημένη απορρόφηση από τα 260 nm και μετά. Τα UV φάσματα των κλασμάτων του δείγματος αυτού δίνονται επίσης στο ίδιο σχήμα.

Όταν το δείγμα διέλθει από τη μεμβράνη 1, παρατηρείται ότι οι ενώσεις με $MB < 12000$ έχουν φάσμα με ώμο στα 225-230 nm, ενώ αυτές που παραμένουν στο εσωτερικό της μεμβράνης, έχουν φάσμα παρόμοιο του αρχικού.

Από τις ενώσεις με $MB < 12000$, αυτές που έχουν $MB < 500$ παρουσιάζουν έντονο ώμο στα 225-230 nm. Οι εντός της μεμβράνης 2 ενώσεις, δίνουν φάσμα παρόμοιο με το αρχικό και με το φάσμα στο εσωτερικό της μεμβράνης 1.



δείγμα D6

MB > 12000
(εντός μεμβράνης)MB < 12000
(εκτός μεμβράνης)12000 > MB > 500
(εντός μεμβράνης)MB < 500
(εκτός μεμβράνης)

ΣΧΗΜΑ 3.17 : UV φάσματα του D6 και των κλασμάτων του



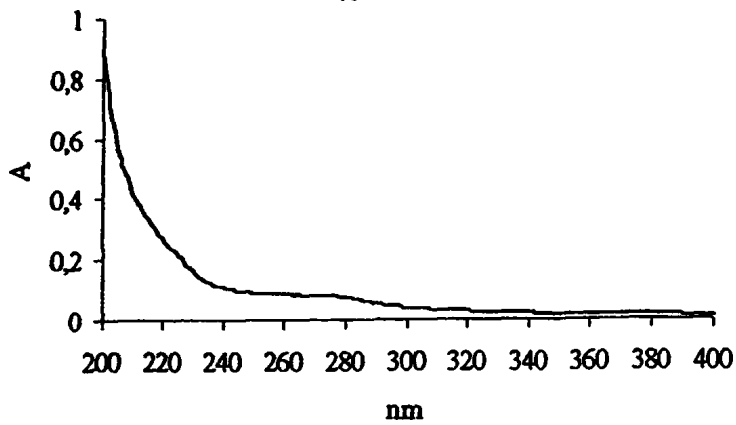
Ένα δεύτερο δείγμα της ίδιας προέλευσης είναι το D8, το φάσμα του οποίου δίνεται στο σχήμα 3.18. Το δείγμα αυτό δεν έχει αυξημένη απορρόφηση μετά τα 260 nm, όπως το προηγούμενο που μελετήθηκε. Τα UV φάσματα των κλασμάτων του δείγματος αυτού, δίνονται στο σχήμα 3.18.

Όταν το δείγμα διέλθει από τη μεμβράνη 1, δείχνει ότι οι ενώσεις με $MB < 12000$, έχουν φάσμα με ώμο στα 215-230 nm. Οι ενώσεις που μένουν στο εσωτερικό δεν έχουν ώμο, αλλά παρουσιάζουν έντονη απορρόφηση για μήκη κύματος μεγαλύτερα από 260 nm, καθώς επίσης και κορυφή στα 255 nm.

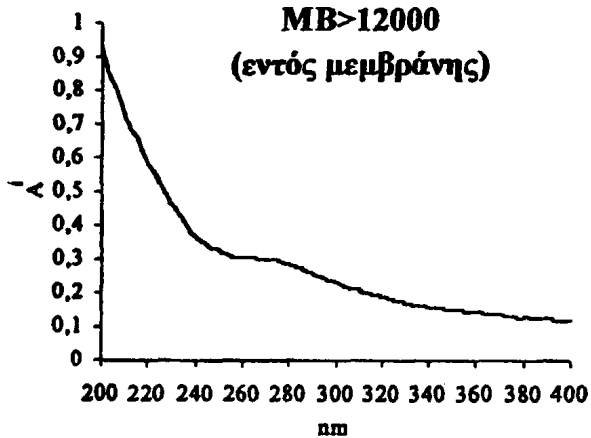
Οι ενώσεις που έχουν $MB < 12000$, όταν εισαχθούν στη μεμβράνη 2, διατηρούν τον ώμο εντός της μεμβράνης, ενώ οι ενώσεις που εξέρχονται δεν απορροφούν πέραν των 250 nm, όπως και οι ενώσεις που εκλύονται τελευταίες με την SEC χρωματογραφία στο δείγμα D10 (όπως θα φανεί σε επόμενη ενότητα).



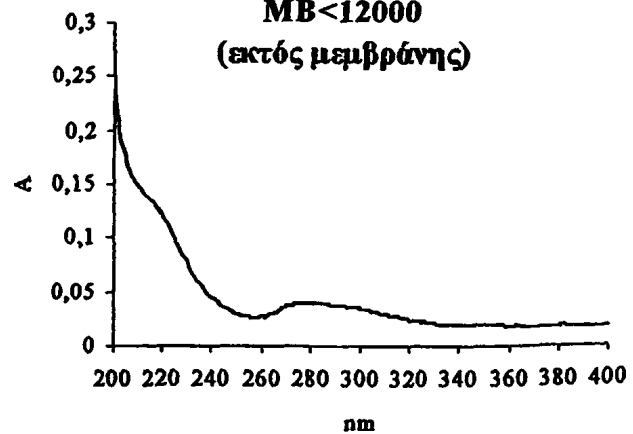
δείγμα D8



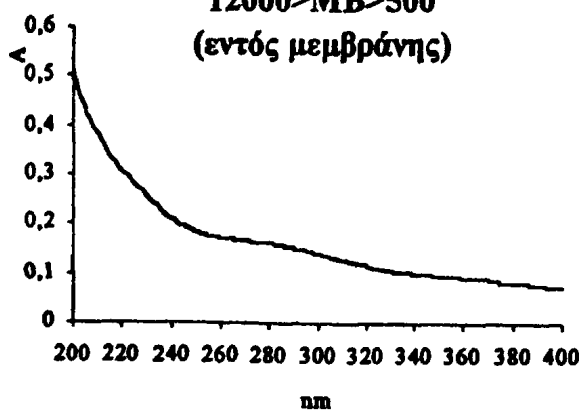
MB>12000 (εντός μεμβράνης)



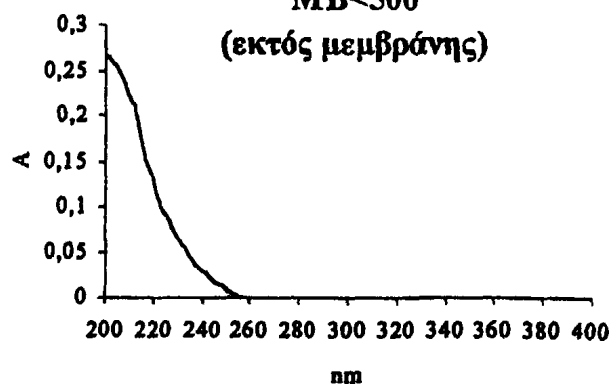
MB<12000 (εκτός μεμβράνης)



12000>MB>500 (εντός μεμβράνης)



MB<500 (εκτός μεμβράνης)



ΣΧΗΜΑ 3.18 : UV φάσματα του D8 και των κλασμάτων του



IV) Επιφανειακά νερά

Δύο δείγματα επιφανειακών νερών διαφορετικής προέλευσης, μελετήθηκαν επίσης με την μέθοδο της διαπίδυσης: ένα δείγμα από μία ευτροφική λίμνη (L14) και ένα δείγμα από νερό ποταμού (R2). Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για να διαπιστωθεί εάν τα νερά αυτά είναι ρυπασμένα. Η διαπίστωση αυτή μπορεί να γίνει με σύγκριση των φασμάτων των δειγμάτων αυτών με φάσματα των λυμάτων. Αν τα φάσματα συμφωνούν μεταξύ τους, γίνεται προφανής η προέλευση της ρύπανσης.

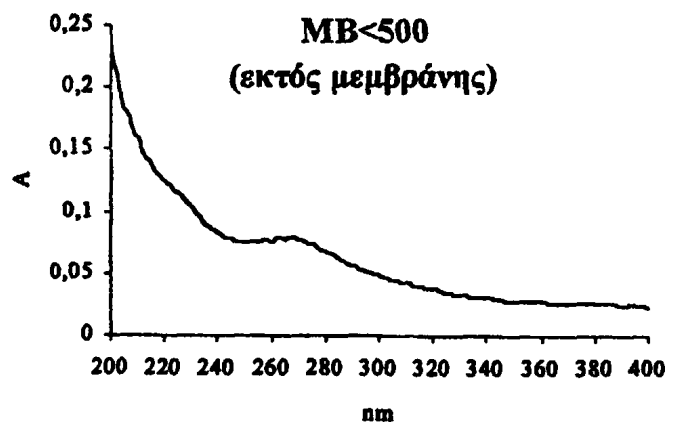
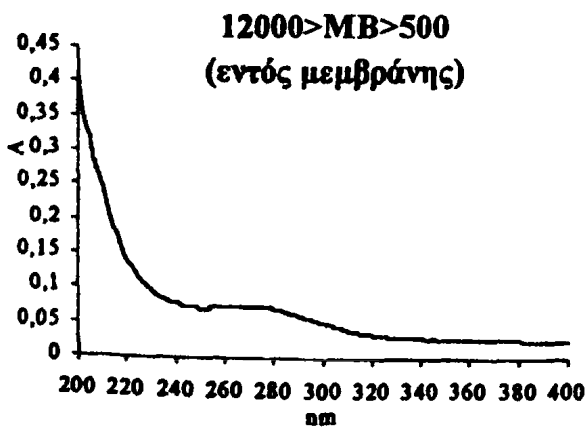
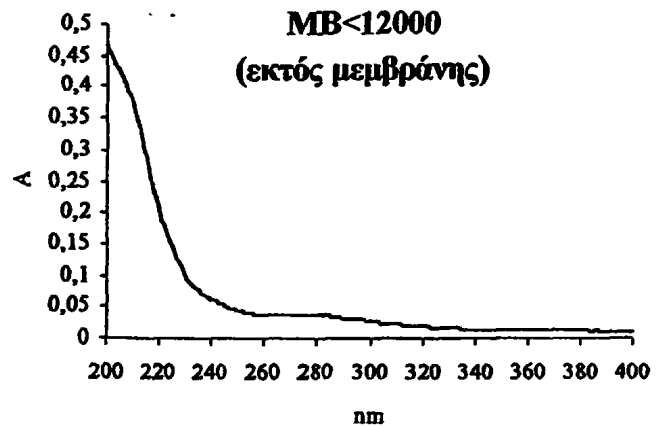
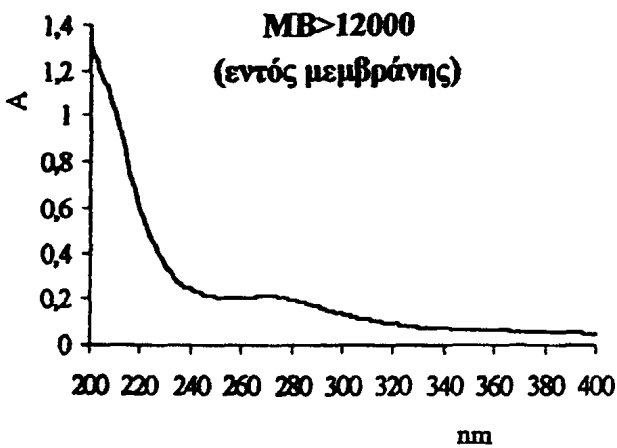
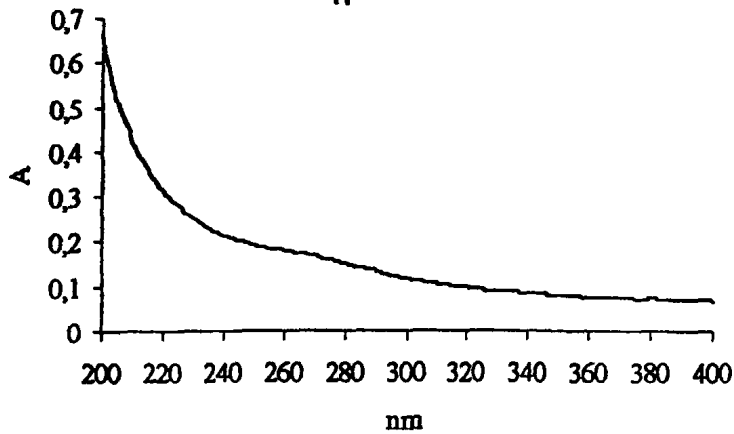
Το φάσμα του δείγματος L14 (σχήμα 3.19) μοιάζει με το φάσμα τύπου I που αντιστοιχεί στις χουμικές ενώσεις (σελ. 26). Τα UV φάσματα των κλασμάτων του δείγματος αυτού, δίνονται επίσης στο σχήμα 3.19.

Παρατηρείται ότι οι ενώσεις με $MB < 12000$ έχουν φάσμα με χαμηλή απορρόφηση μετά τα 240 nm. Το φάσμα αυτό είναι τελείως διαφορετικό από το αρχικό. Οι ενώσεις που παραμένουν στη μεμβράνη και έχουν $MB > 12000$, δίνουν και αυτές διαφορετικό φάσμα από το αρχικό, και έχουν έντονο ώμο στα 270-280 nm.

Όταν οι ενώσεις με $MB < 12000$ εισαχθούν στη μεμβράνη 2, οι ενώσεις που διέρχονται από τη μεμβράνη και οι οποίες έχουν $MB < 500$, δίνουν φάσμα με ώμο στα 220-230 nm και στα 270-280 nm, ενώ αυτές που παραμένουν μέσα στη μεμβράνη, έχουν φάσμα με ώμο στα 270-280 nm.



δείγμα L14



ΣΧΗΜΑ 3.19 : UV φάσματα του L14 και των κλασμάτων του

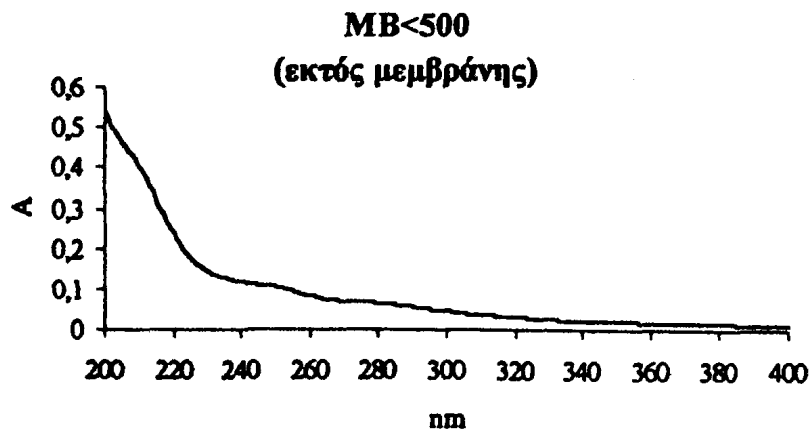
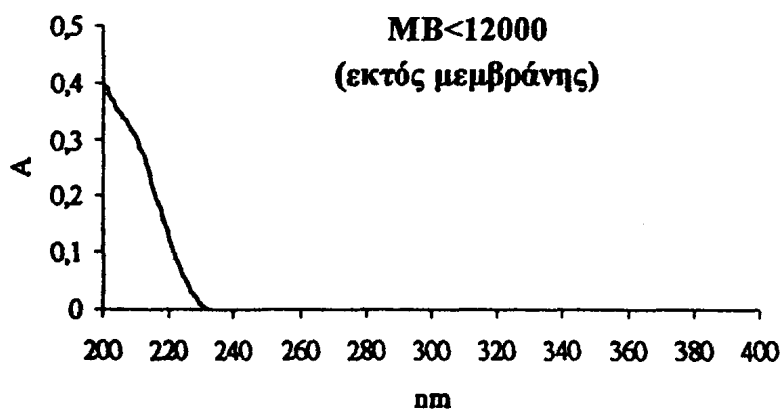
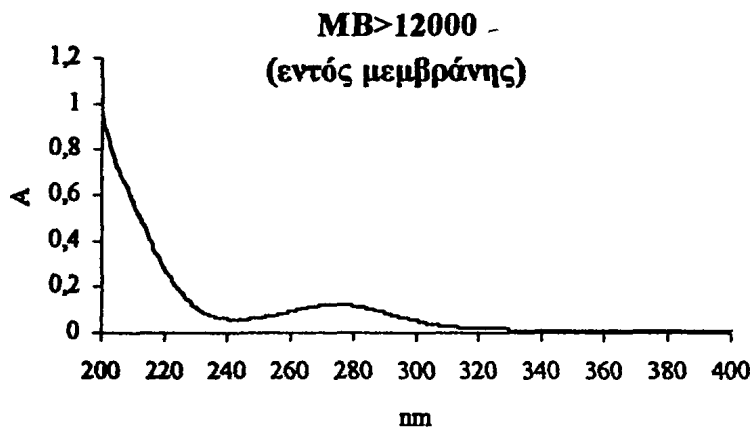
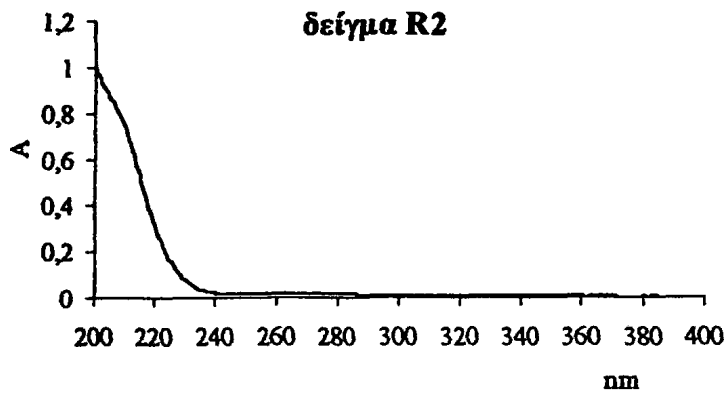


Το δείγμα R2 έχει αρχικό φάσμα με ώμο στα 210 nm και που απορροφάει μέχρι τα 230 nm (σχήμα 3.20). Τα UV φάσματα των κλασμάτων του δείγματος αυτού, δίνονται επίσης στο σχήμα 3.20.

Όταν το δείγμα εισαχθεί στη μεμβράνη 1, βλέπουμε ότι οι ενώσεις με $MB < 12000$ έχουν φάσμα παρόμοιο με το αρχικό, δηλαδή με ώμο στα 210 nm και που απορροφούν μέχρι τα 230 nm. Οι εντός της μεμβράνης ενώσεις που έχουν $MB > 12000$, δίνουν διαφορετικό φάσμα που έχει ώμο στα 280 nm.

Όταν οι ενώσεις με $MB < 12000$ εισαχθούν στη μεμβράνη 2, στο εσωτερικό της δεν παίρνουμε κάποιο φάσμα, ενώ στο εξωτερικό της οι ενώσεις δίνουν φάσμα με ώμο στα 210 nm, στα 240-250 nm και συνεχίζουν να απορροφούν και πέραν των 250 nm.





ΣΧΗΜΑ 3.20 : UV φάσματα του R2 και των κλασμάτων του



Στον παρακάτω πίνακα δίνονται τα μήκη κύματος (λ) των κορυφών απορρόφησης που εμφανίζονται στα κλάσματα που προέκυψαν με την τεχνική της διαπίδυσης, αλλά και στα αρχικά δείγματα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Μήκη κύματος που εμφανίζονται στα κλάσματα από την τεχνική της διαπίδυσης και στα αρχικά δείγματα

Δείγμα	Αρχικό	Διαπίδυση MB> 12000	Διαπίδυση MB<12000	Διαπίδυση 12000>MB>500	Διαπίδυση MB<500
		Κλάσμα a	Κλάσμα b	Κλάσμα c	Κλάσμα d
M20	225,265- 275	225, 265- 275	225, 265- 275	225, 265-275	-
M21	222, 270	270	225, 270	208, 270	208,255
U4	225, 290- 300	225, 265	225, 290- 300	265	<200
P3	225, 265- 275	222, 265- 275	225, 265- 275	275	-
P5	208, 225, 260-270	208, 225, 260-270	208, 227, 300-310	275	208, 260- 270
D6	275	224, 270	218, 270	270	227, 270
D8	275	270	218, 270	270	203
L14	208, 222, 270	208, 270	208, 275	208, 275	222, 270
R2	208	275	210	-	208, 250, 280

Όπου a, b, c, d είναι τα κλάσματα με MB>12000, MB<12000, 12000>MB>500 και MB<500, αντίστοιχα.

Από τον παραπάνω πίνακα σε γενικές γραμμές συμπεραίνουμε τα εξής:

- Ενώσεις που έχουν ώμους ή κορυφές απορρόφησης στα 225 και 265-275 nm, ή τα 225 και στα 290-300 nm ή στα 208-218 nm έχουν MB κάτω από 12000.



- Ενώσεις που έχουν ώμους ή κορυφές στα 208 και 250-255 nm ή στα 208 και στα 270 nm έχουν MB μικρότερο από 500.
- Ειδικότερα, αυτές που έχουν μέγιστο στην περιοχή από 200-208 nm έχουν MB μικρότερο από 500.

3.2.3 Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων

Τα δεδομένα των UV φασμάτων των δειγμάτων που προαναφέρθηκαν κατηγοριοποιήθηκαν με τη μέθοδο της ανάλυσης σε συστάδες. Στον πίνακα 5 περιγράφονται τα αποτελέσματα ανά κατηγορία MB όπως προέκυψαν από το σχήμα 3.21.

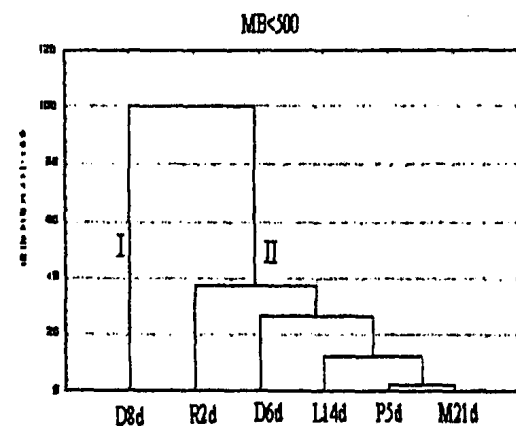
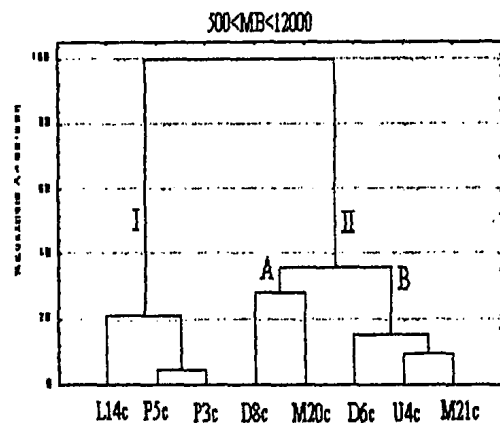
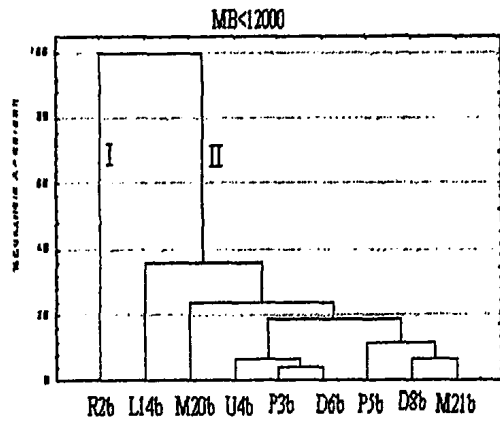
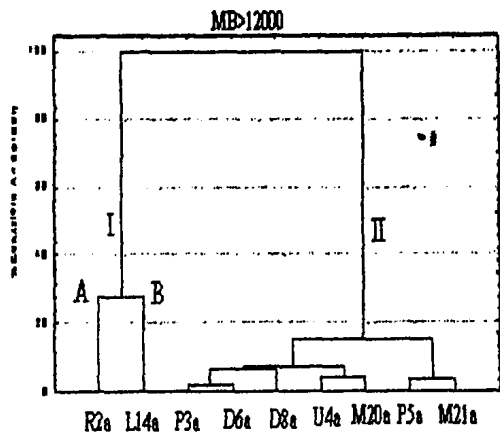
ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Ανάλυση κατά συστάδες των 9 δειγμάτων πριν και μετά εκάστη κλασμάτωση με μεμβράνες.

Φάσματα Κλασμάτων MB>12000			Φάσματα Κλασμάτων MB<12000		Φάσματα Κλασμάτων 500<MB<12000			Φάσματα Κλασμάτων MB<500	
Κατηγορία /Υποκατηγορία									
I/A	I/B	II	I	II	I/A	I/B	II	I	II
R2	L14	λοιπά	R2	λοιπά	L14	P3 P5	λοιπά	D8	λοιπά

Συμπέρασμα

Με βάση την Ανάλυση Συστάδων στα δείγματα αυτά φαίνεται πως η πολυπλοκότητα της κατηγοριοποίησης των δειγμάτων με βάση τα αρχικά φάσματά τους γίνεται πολύ γρήγορα. Ακόμη φαίνεται πως η κατηγοριοποίηση των κλασμάτων δίνει περισσότερες λεπτομέρειες συγκρίνοντάς την με τα αρχικά φάσματα. Ειδικότερα φαίνεται πως τα φάσματα των επιφανειακών νερών ξεχωρίζουν από τα υπόλοιπα στα κλάσματα που είναι εμπλουτισμένα σε ενώσεις MB>12000, ενώ τα φάσματα των κλασμάτων 500<MB<12000 διακρίνουν και αστικά λύματα και κλάσματα με ενώσεις MB<500 διακρίνουν και τα βιομηχανικά. Παρ' όλα αυτά η κατηγοριοποίηση αυτή δεν θεωρείται ικανοποιητική.





ΣΧΗΜΑ 3.21: Ανάλυση σε Συστάδες των κλασμάτων μετά τη διαπίδυση δειγμάτων



3.3 ΦΑΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ

3.3.1 Συμπεριφορά των ενώσεων αναφοράς

Για να γίνει η επικύρωση (validation) της δυνατότητας κατηγοριοποίησης των απόνερων με βάση την κλασμάτωση σε ενώσεις (που περιέχονται σ'αυτά) διαφορετικών μοριακών βαρών, εφαρμόστηκε η τεχνική της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους (SEC). Για τον προσδιορισμό των παραμέτρων της στήλης και τη βελτιστοποίηση συνθηκών διαχωρισμού, χρησιμοποιήθηκε μία σειρά ενώσεων αναφοράς σε δύο διαφορετικές στήλες και με τρεις διαφορετικού pH κινητές φάσεις. Τα αποτελέσματα δίνονται ακολούθως.

A. Στήλη Sephadex G-25

Μέγεθος κλάσματος: 3,5 ml

Επαναληψιμότητα της μεθόδου. Για την εξέταση της επαναληψιμότητας του διαχωρισμού με τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκε διάλυμα εξαγλυκίνης συγκέντρωσης 0,12 mg/ml. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε για την έκλουση ήταν με το ρυθμιστικό με pH 6,4. Οι όγκοι έκλουσης που βρέθηκαν είναι 147,0, 147,0 και 150,5 ml. Άρα = $148,2 \pm 0,2$ ml.

Υπολογισμός νεκρού όγκου. Για τη μέτρηση του νεκρού όγκου V_0 χρησιμοποιήθηκε η κυανή δεξτράνη (2000 kDa). Βρέθηκε ότι $V_0 = 81$ ml (κλάσμα 23°).



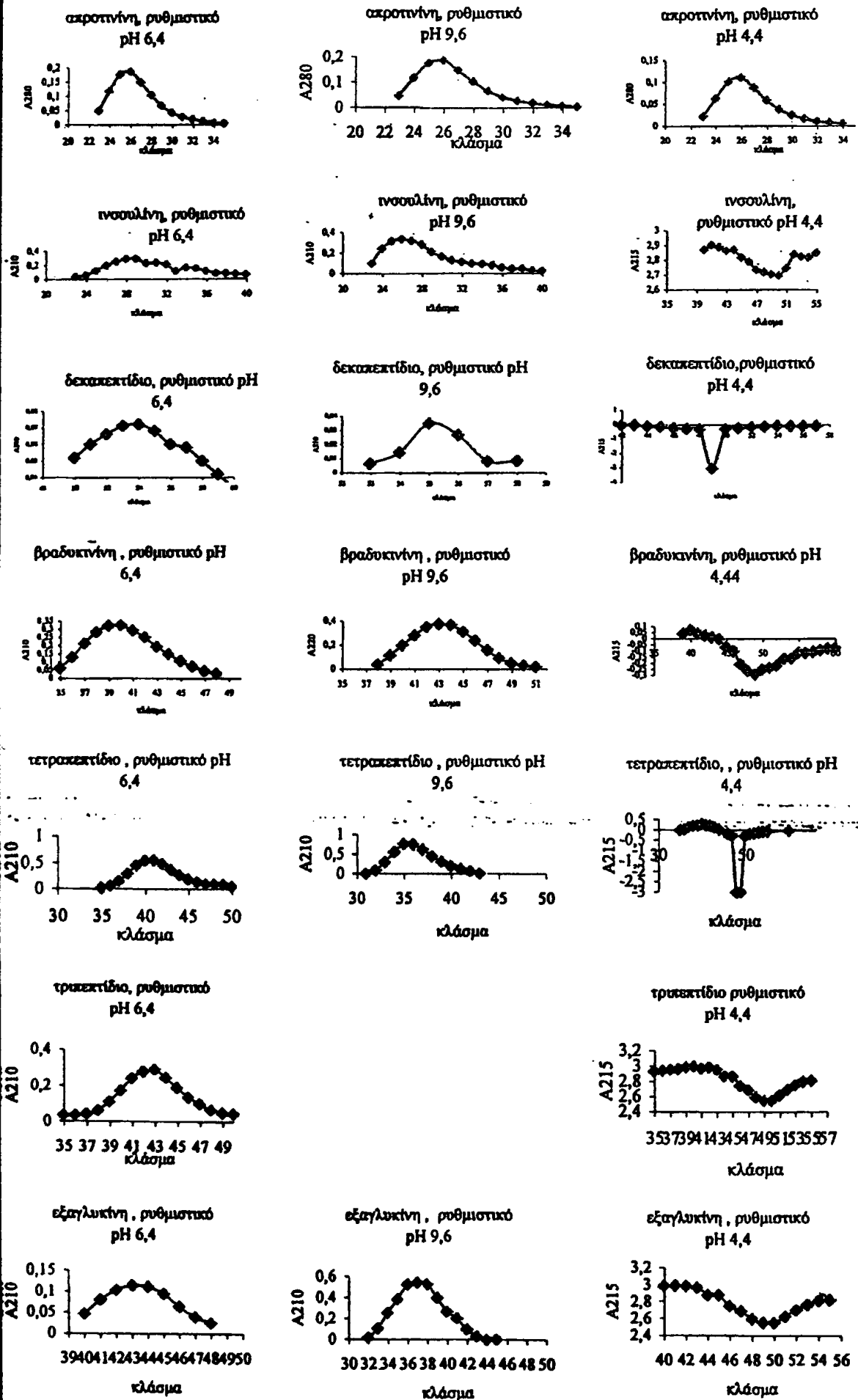
Η στήλη αυτή έχει $V_i = 201 \text{ ml}$ που σημαίνει ότι από το 56-57° κλάσμα και έπειτα εκλύονται οι ενώσεις που δεν επηρεάζονται καθόλου από το μέγεθος των πόρων (έχουν μικρότερο μέγεθος).

Έκλυση ενώσεων αναφοράς

Τα SEC χρωματογραφήματα των ενώσεων αναφοράς εκτός από την εξατυροσίνη δίνονται στο σχήμα 3.22.

Στον πίνακα 6 αναφέρονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις.





ΣΧΗΜΑ 3.22: SEC χρωματογραφήματα των ενώσεων αναφοράς στην στήλη Sephadex G-25



ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Οι ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, το MB τους, το κλάσμα στο οποίο εκλούσθηκαν με καθένα από τα τρία εκλουστικά, καθώς και το pI τους

Ένωση	MB	κλάσμα (ρυθμ. 6,4)	κλάσμα (ρυθμ.9,6)	κλάσμα (ρυθμ. 4,4)	pI
Εξαγλυκίνη	360,3	43	37	50	5,52
Τριπεπτίδιο	393	43	35	49	6,92
Τετραπεπτίδιο	427	41	35	49	5,33
Εξατυροσίνη	997,1	-	-	-	5,52
Βραδυκινίνη	1060,2	40	41	49	12,00
Δεκαπεπτίδιο	1155	54	55	49	~5
Ινσουλίνη Β	3495,9	29	28	50	5,30
Απροτινίνη	6500	26	26	26	10,50

Απροτινίνη: Παρατηρείται ότι η απροτινίνη σωστά εκλούεται κοντά στον νεκρό όγκο της στήλης αφού έχει MB μεγαλύτερο του ορίου αποκλεισμού του υλικού της στήλης (δεν περνάει από τους πόρους) και στο ίδιο κλάσμα ανεξαρτήτως από το pH του εκλουστικού μέσου. Η απροτινίνη δείχνει θετική απορρόφηση. Επειδή έχει pI 10,5 (βασική πρωτεΐνη) στα ρυθμιστικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι θετικά φορτισμένη.

Ινσουλίνη Β: Η ένωση αυτή, περνάει από τους πόρους της στήλης, ως αναμένεται, και βγαίνει λίγο αργότερα από την απροτινίνη όταν εκλούεται με τα ρυθμιστικά διαλύματα pH 6,4 και 9,6, ενώ παρουσιάζει με θετική απορρόφηση (αρνητικά φορτισμένη σε αυτά τα ρυθμιστικά διαλύματα). Όταν όμως εκλούεται με το όξινο ρυθμιστικό καθυστερεί πάρα πολύ η έκλουσή της (50° κλάσμα), ενώ βγαίνει και με αρνητική κορυφή, επειδή όταν εκλούεται η ινσουλίνη μειώνεται η συγκέντρωση του φθαλικού ανιόντος - που απορροφά έντονα - στο έκλουσμα που περνά από την κυψελίδα. Η καθυστέρηση έκλουσης στο pH αυτό, οφείλεται στο μικρό θετικό φορτίο της ινσουλίνης που οδηγεί σε φαινόμενο προσρόφησης στις αρνητικά φορτισμένες υδροξυλικές ομάδες της επιφάνειας του υλικού της στήλης.



Δεκαπεπτίδιο: Το πεπτίδιο αυτό εκλύεται αργά (54-55° κλάσμα) με τα ρυθμιστικά διαλύματα σε pH 6,4 και 9,6 (αρνητικά φορτισμένο στα pH αυτά) και δείχνει θετική απορρόφηση. Εκλύεται λίγο πιο γρήγορα (49° κλάσμα) με το ρυθμιστικό pH 4,4 με αρνητική απορρόφηση που οφείλεται στον πιο πάνω αναφερθέντα λόγο.

Βραδυκινίνη: Η βραδυκινίνη που είναι βασικό πεπτίδιο και έχει ελάχιστα μικρότερο MB από το δεκαπεπτίδιο, είναι θετικά φορτισμένο σε όλα τα pH, εκλύεται και αυτή στο 49° κλάσμα με ρυθμιστικό σε pH 4,4 με αρνητική απορρόφηση, αλλά εκλύεται πολύ νωρίτερα με τα άλλα δύο ρυθμιστικά (40°-41° κλάσμα) και με θετική απορρόφηση. Αυτό συμβαίνει, επειδή στα υψηλότερα pH βρίσκεται με μικρότερο θετικό φορτίο και η προσρόφηση λόγω ελκτικών δυνάμεων είναι μικρότερη από τις αρνητικά φορτισμένες υδροξυλικές ομάδες της επιφάνειας του υλικού της στήλης.

Εξατυροσίνη: Η εξατυροσίνη προσροφήθηκε πλήρως στο υλικό της στήλης αυτής. Αυτό συμβαίνει λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με το υλικό των σφαιριδίων.

Τετραπεπτίδιο: Εκλύεται πολύ πιο αργά με το ρυθμιστικό διάλυμα με pH 4,4 (θετικά φορτισμένο) και με αρνητική απορρόφηση. Με το ρυθμιστικό διάλυμα με pH 6,4 λίγο νωρίτερα (41° κλάσμα), ενώ με το ρυθμιστικό διάλυμα pH 9,6 εκλύεται πολύ γρήγορα (35° κλάσμα) πιθανόν γιατί βρίσκεται υπό τη μορφή ανιόντος ισχυρά φορτισμένου.

Τριπεπτίδιο: Το πεπτίδιο αυτό εκλύεται ακριβώς όπως το προηγούμενο, με τη διαφορά ότι στο ρυθμιστικό διάλυμα με pH 6,4 βγαίνει λίγο αργότερα (αναμενόμενο, αφού έχει λίγο μικρότερο MB).

Εξαγλυκίνη: Η εξαγλυκίνη που έχει ελαφρώς μικρότερο MB από το τριπεπτίδιο, εκλύεται στο 50° κλάσμα στο ρυθμιστικό διάλυμα με pH 4,4 (θετικά φορτισμένη) και έχει αρνητική απορρόφηση. Στο ρυθμιστικό διάλυμα με pH 6,4 (αρνητικά φορτισμένη) εκλύεται στο 43° κλάσμα, ενώ στο ρυθμιστικό διάλυμα με pH 9,6 (αρνητικά φορτισμένη) εκλύεται ακόμη πιο γρήγορα, στο 37° κλάσμα, αλλά όχι πιο γρήγορα από τα δύο προηγούμενα πεπτίδια. Στα δύο αυτά ρυθμιστικά διαλύματα παρουσιάζει θετική απορρόφηση.



Σε γενικές γραμμές όταν χρησιμοποιείται όξινο ρυθμιστικό διάλυμα, οι ενώσεις βγαίνουν καθυστερημένα και με αρνητική απορρόφηση. Το γεγονός ότι βγαίνουν αργά είναι αναμενόμενο, αφού είναι όλες φορτισμένες θετικά στο pH αυτό. Η αρνητική απορρόφηση εξηγείται από το γεγονός, ότι το όξινο φθαλικό κάλιο απορροφά στην περιοχή που απορροφούν και οι ενώσεις αναφοράς.

Επίσης, οι περισσότερες από τις πρότυπες ενώσεις που μελετήθηκαν εκλούνται πολύ πιο γρήγορα από ότι αναμένονταν (γρηγορότερα από τον όγκο κλίνης V_i που αντιστοιχεί στο 56-57° κλάσμα) μπορεί να λεχθεί ότι ακολουθούν συμπεριφορά μη ιδανικής χρωματογραφίας αποκλεισμού (Non-Ideal SEC).

Αν υπήρχαν αλληλεπιδράσεις με το υλικό των σφαιριδίων θα έπρεπε να ήταν είτε αμφίδρομες οπότε η έκλυση να γίνονταν πέραν του 56^{ου} κλάσματος ή μη αμφίδρομες οπότε θα υπήρχε ενσωμάτωση αυτών των ενώσεων στους πόρους του υλικού. Μία άλλη πιθανότητα είναι η παγίδευση της ένωσης αναφοράς στους πόρους του υλικού, οπότε αργεί να εκλουσθεί. Εκλούνται δηλαδή από το 40° κλάσμα και μετά οι ενώσεις που έχουν $MB < 1000$. Ενώσεις που αποτελούνται από πολλούς αρωματικούς δακτυλίους, όπως είναι η εξατυροσίνη αλληλεπιδρούν ισχυρά με το υλικό της στήλης και δεν εκλούνται καθόλου.

B. Στήλη Sephadex G-15

Μέγεθος κλάσματος: 2,8 ml

Επαναληψιμότητα της μεθόδου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε διάλυμα εξαγλυκίνης συγκέντρωσης 0,06 mg/ml. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε για την έκλυση ήταν στο ρυθμιστικό διάλυμα με pH 6,4. Οι όγκοι έκλυσης που βρέθηκαν είναι 42,0, 45,5 και 42,0 ml. Άρα = $43,2 \pm 1,2$ ml.



Υπολογισμός νεκρού όγκου. Για τη μέτρηση του νεκρού όγκου V_0 της στήλης χρησιμοποιήθηκε και στην περίπτωση αυτή η κυανή δεξτράνη (2000 kDa). Βρέθηκε ότι: $V_0 = 25,6$ ml (κλάσμα 9°).

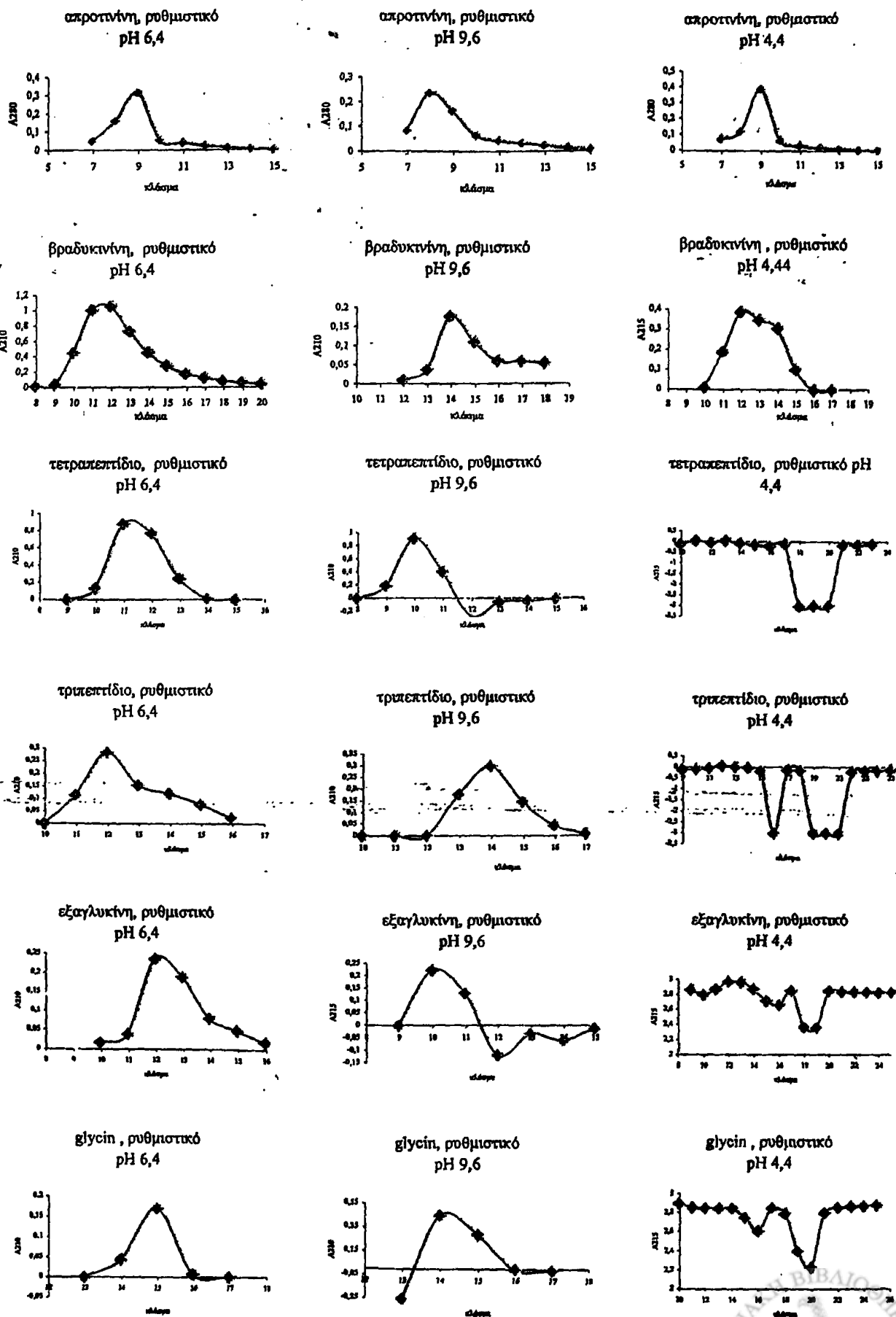
Η στήλη αυτή έχει $V_i = 82$ ml που σημαίνει ότι από το 22-23° κλάσμα και έπειτα εκλούνται οι ενώσεις που δεν επηρεάζονται καθόλου από το μέγεθος των πόρων (έχουν μικρότερο μέγεθος από τους πόρους).

Έκλυση ενώσεων αναφοράς

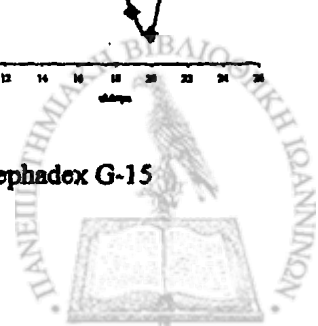
Τα SEC χρωματογραφήματα των ενώσεων αυτών εκτός από την εξατυροσίνη δίνονται στο σχήμα 3.23

Στον πίνακα 7 αναφέρονται τα αποτελέσματα από τις εκλούσεις των ενώσεων με τη στήλη αυτή.





ΣΧΗΜΑ 3.23: SEC χρωματογραφήματα των ενώσεων αναφοράς στην στήλη Sephadex G-15



ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Οι ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, το MB τους, το κλάσμα στο οποίο εκλούσθηκαν με καθένα από τα τρία εκλουστικά, καθώς και το pI τους

Ένωση	MB	κλάσμα (ρυθμ. 6,4)	κλάσμα (ρυθμ. 9,6)	κλάσμα (ρυθμ. 4,4)	pI
Glycin	167,2	15	15	20	-
Εξαγλυκίνη	360,3	12	10	19	5,52
Τριπεπτιδίο	393	12	14	19	6,92
Τετραπεπτιδίο	427	11	10	19	5,33
Εξατυροσίνη	997,1	-	-	-	5,52
Βραδυκτινίνη	1060,2	12	14	13	12,00
Απροτινίνη	6500	9	8	9	10,50

Απροτινίνη: Βλέπουμε ότι η απροτινίνη σωστά εκλούεται στον νεκρό όγκο της στήλης (όπως αυτός μετρήθηκε με την κυανή δεξτράνη) και στο ίδιο σχεδόν κλάσμα ανεξαρτήτως από το pH του ρυθμιστικού διαλύματος (θετικά φορτισμένη σε όλα τα pH). Επίσης, το φάσμα της είναι θετικό.

Βραδυκτινίνη: Το αμέσως μικρότερο πεπτιδίο που χρησιμοποιήθηκε, η βραδυκτινίνη που είναι και αυτή θετικά φορτισμένη σε όλα τα pH, εκλούεται στο ίδιο σχεδόν κλάσμα ανεξαρτήτως του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε. Η απορρόφηση και αυτού του πεπτιδίου είναι θετική.

Εξατυροσίνη: Η ένωση αυτή προσροφήθηκε στο υλικό της στήλης, λόγω ισχυρών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.

Τετραπεπτιδίο: Το πεπτιδίο αυτό εκλούεται πολύ αργά (19^ο κλάσμα) σε pH 4,4 (θετικά φορτισμένο) δείχνοντας αρνητική απορρόφηση. Με το ρυθμιστικό διάλυμα με pH 6,4 (αρνητικά φορτισμένο) εκλούεται νωρίτερα (11^ο κλάσμα) ενώ με το ρυθμιστικό διάλυμα με pH 9,6 ακόμα πιο γρήγορα, στο 10^ο κλάσμα (αναμενόμενο, αφού είναι ισχυρώς αρνητικά φορτισμένο στο pH αυτό)

Τριπεπτιδίο: Εκλούεται και αυτό πολύ αργά (19^ο κλάσμα) σε pH 4,4 (θετικά φορτισμένο) δείχνοντας αρνητική απορρόφηση. Με το ρυθμιστικό διάλυμα με pH 6,4 (αρνητικά



φορτισμένο) εκλούεται νωρίτερα (στο 12° κλάσμα) ενώ σε pH 9,6 πιο αργά (στο 14° κλάσμα).

Εξαγλυκίνη: Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και με την εξαγλυκίνη, η οποία εκλούστηκε αργά σε pH 4,4 (στο 19° κλάσμα) και με αρνητική απορρόφηση, γρηγορότερα (στο 12° κλάσμα) στο pH 6,4, ενώ σε pH 9,6 ακόμη πιο γρήγορα (στο 10ο κλάσμα). Στα δύο τελευταία ρυθμιστικά διαλύματα έδειξε θετική απορρόφηση.

Glycin: Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και με την ένωση αυτή οι οποία εκλούστηκε γρηγορότερα στα ρυθμιστικά διαλύματα με pH 6,4 και 9,6 (15° κλάσμα) και με θετική απορρόφηση, ενώ με το όξινο ρυθμιστικό διάλυμα εκλούστηκε αργότερα (20° κλάσμα) και με αρνητική απορρόφηση.

ΜΕΧΡΙ ΣΤΙΓΜΗΣ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι ενώσεις που δεν κατακρατούνται από τις στήλες λόγω μεγέθους (όπως η απροτινίνη) εκλούνται αμέσως και ανεξάρτητα από το εκλουστικό που θα χρησιμοποιηθεί. Οι ενώσεις που περνούν από τους πόρους υφίστανται αλληλεπιδράσεις με τα στερεά τοιχώματα, όπως η απώθηση, η προσρόφηση, η ιονανταλλαγή. Αυτοί οι μηχανισμοί έχουν ως συνέπεια την γρήγορη ή την καθυστερημένη έκλουσή τους.

Σε γενικές γραμμές, οι ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν παρουσίασαν την ίδια συμπεριφορά στις δύο στήλες. Το όξινο ρυθμιστικό διάλυμα μπορεί να εκλούει πιο αργά τις ενώσεις, αλλά τις εκλούει όμως στο ίδιο κλάσμα και δείχνει αρνητική απορρόφηση, οπότε δεν έχουμε καλή εικόνα για το φάσμα τους. Για τους λόγους αυτούς απορρίπτεται το όξινο ρυθμιστικό διάλυμα, και από τα άλλα δύο ρυθμιστικά διαλύματα επιλέχθηκε αυτό που έχει pH 6,4 ώστε να είναι πιο κοντά στο pH των περισσότερων πραγματικών δειγμάτων.



3.3.2 Στατιστική εκτίμηση της συμπεριφοράς έκλουσης των ενώσεων αναφοράς στις δύο στήλες με την πολλαπλή γραμμική συμμεταβολή

Για να μελετηθεί η συμπεριφορά έκλουσης των ενώσεων αναφοράς στις δύο στήλες, δοκιμάσθηκε καταρχήν η κλασσική γραμμική σχέση μεταξύ του όγκου έκλουσης και του MB των ενώσεων $V_R = f(\log MB)$, όπου V_R ο όγκος έκλουσης και MB το μοριακό βάρος της κάθε ένωσης. Η σχέση αυτή όμως, δεν έδωσε καλούς συντελεστές συσχέτισης για καμία από τις δύο στήλες που εξετάσθηκαν. Έτσι, αντί για το μοριακό βάρος, χρησιμοποιήθηκαν κάποιες χαρακτηριστικές δομικές παράμετροι της κάθε ένωσης, όπως έχει γίνει σε μία προηγούμενη μελέτη⁵⁵.

Στη μελέτη αυτή, στη SEC χρωματογραφία⁵⁵ χρησιμοποιήθηκε μία ευρεία κλίμακα ενώσεων χαμηλού MB, όπως αλειφατικά καρβοξυλικά οξέα, αρωματικά καρβοξυλικά οξέα, σάκχαρα, αλκοόλες και αμινοξέα. Βρέθηκε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της συμπεριφοράς έκλουσης των ενώσεων αυτών και των δομικών παραμέτρων τους. Ως δομικές παράμετροι χρησιμοποιήθηκαν οι ατομικοί λόγοι του C ή του O μεταξύ των λειτουργικών ομάδων. Οι ερευνητές βρήκαν τον υψηλότερο συντελεστή συσχέτισης με την εξίσωση: $\Delta K_d = 0,21 - 1,24 \text{ Ph/O} - 0,18 \text{ C/O} + 0,35 \text{ COOH/O} - 0,47 \text{ (N+S)/C} + 0,07 \text{ C/H}$, όπου Ph/O και COOH/O είναι το οξυγόνο των φαινολικών και των καρβοξυλικών ομάδων, αντίστοιχα.

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν με την πολλαπλή γραμμική συσχέτιση ως ανεξάρτητες μεταβλητές, οι δομικές παράμετροι των ενώσεων, C/O, C/H, N/C και N/O και ως εξαρτημένη μεταβλητή, τα κλάσματα στα οποία εκλούσθηκαν (αντί για τους όγκους). Μελετήθηκαν τα δεδομένα έκλουσης για την κάθε στήλη και το κάθε εκλουστικό ξεχωριστά. Δοκιμάσθηκε η συμμετοχή όλων των ανεξάρτητων μεταβλητών αλλά και συνδυασμών τους ανά δύο ή ανά τρεις, προκειμένου να βρεθεί η καλύτερη γραμμική συσχέτιση.

Π) Στήλη Sephadex G-25

A) Για το ρυθμιστικό διάλυμα με pH 6,4 προκύπτουν τα παρακάτω αποτελέσματα που δίνονται στον πίνακα 8. Στον πίνακα γράφονται οι παράμετροι του πολυώνυμου μερικής συμμεταβολής (coefficients), η τεταγμένη επί την αρχή (intercept), η πειραματική τιμή



F_{exp} , η θεωρητική F_{tabl} , όπως προκύπτει από πίνακες ανάλογα με τους βαθμούς ελευθερίας ($k, n-k-1$: όπου k ο αριθμός των μεταβλητών και n ο αριθμός των μετρήσεων) και ο συντελεστής πολλαπλής συσχέτισης R^2 .

ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Αποτελέσματα της επεξεργασίας των δεδομένων SEC με την τεχνική της πολλαπλής γραμμικής συσχέτισης με βάση τις δομικές παραμέτρους των ενώσεων και στατιστική εκτίμησή τους με το κριτήριο F (για επίπεδο εμπιστοσύνης 0,05)

pH=6,4

Τεταγμ.	C/O	C/H	N/C	N/O	F_{exp}	F_{tabl}	R^2
-139,352	-13,244	264,633	38,973	32,279	2,444670	19,2	0,83020168
-155,602	-0,400	243,867	122,678		3,574129	9,28	0,78137964
-156,620		233,243	124,188	0,218	3,549538	>>	0,78019747
-1,7469	9,7529		97,1920	-22,1574	0,1089229	>>	0,09822408
-125,958	-18,412	269,453		44,952	4,595264	>>	0,82127743
-14,7845	-2,9278	97,0080			0,5555439	6,94	0,21738774
-156,529		233,367	124,384		7,096570	>>	0,78013690 *
39,01322	-2,42254			7,78881	0,0858753	>>	0,04116991
-12,1109		71,9068		3,7245	0,3886313	>>	0,16270042
25,13021	1,06421		31,83144		0,865207	>>	0,06983513
29,40582			24,56595	1,58847	0,1369199	>>	0,0640739

* σχετικά χαμηλό

Από τον πίνακα 9 φαίνεται ότι μόνο στην περίπτωση που έχουμε τις δύο μεταβλητές C/H και N/C στο μοντέλο, τα αποτελέσματα είναι στατιστικώς σημαντικά ($F_{exp} > F_{tabl}$). Για όλες τις άλλες περιπτώσεις δεν έχουμε σημαντικότητα από τις εξισώσεις της γραμμικής συμμεταβολής.

Οι δύο δομικές παράμετροι που παίζουν το μεγαλύτερο ρόλο στην έκλυση των ενώσεων είναι οι C/H και N/C και ιδιαίτερα ο C/H.

B) Για το ρυθμιστικό διάλυμα με pH 9,6 προκύπτουν τα παρακάτω δεδομένα που φαίνονται στον πίνακα 9.



ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Αποτελέσματα της επεξεργασίας των δεδομένων SEC με την τεχνική της πολλαπλής γραμμικής συσχέτισης με βάση τις δομικές παραμέτρους των ενώσεων και στατιστική εκτίμησή τους με το κριτήριο F (για επίπεδο εμπιστοσύνης 0,05)

pH=9,6

Τεταγμ.	C/O	C/H	N/C	N/O	F _{exp}	F _{tabl}	R ²
-167,839	-1,418	265,467	94,466	2,053	3,617330	19,2	0,878562 06
-168,873	-0,601	263,574	99,789		7,221772	9,28	0,878371 72
-169,688		262,106	103,590	-1,380	7,197352	>>	0,878009 39
-135,375	-13,945	277,150		32,770	4,814346	>>	0,828011 62
-29,8008	21,6513		152,8682	-52,5557	0,202494 0	>>	0,168395 02
-54,3296	-2,6571	151,4376			2,154530	6,94	0,518597 81
-170,265		261,322	102,350		14,08628	>>	0,875670 47
34,30864	2,50122			-5,45490	0,066790 5	>>	0,032316 06
-49,1485		127,5306		1,5447	1,729841	>>	0,463784 19
33,94978	1,04240		-2,16233		0,029238 3	>>	0,014408 52
39,35796			-8,36093	0,15985	0,012331 2	>>	0,006127 82

Από τον πίνακα φαίνεται ότι μόνο στην περίπτωση που έχουμε τις δύο μεταβλητές C/H και N/C στο μοντέλο, τα αποτελέσματα είναι στατιστικώς σημαντικά ($F_{exp} > F_{tabl}$). Για όλες τις άλλες περιπτώσεις δεν έχουμε σημαντικότητα από τις εξισώσεις της γραμμικής συμμεταβολής.



Άρα, και με το αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα ως εκλουστικό μέσο, παρατηρείται ότι οι παράμετροι C/H και N/C της κάθε ένωσης παίζουν το μεγαλύτερο ρόλο στην έκλουση τους. Ιδιαίτερα, ο δομικός παράγων C/H εξηγεί το μηχανισμό έκλουσης περισσότερο από τον N/C.

Γ) Για το ρυθμιστικό διάλυμα με pH 4,4 δεν υπήρξε σε καμία από τις περιπτώσεις σημαντικότητα σύμφωνα με το κριτήριο F.

II) Στήλη Sephadex G-15

Για το ρυθμιστικό διάλυμα με pH 6,4 προκύπτουν τα παρακάτω αποτελέσματα που δίνονται στον πίνακα 10.

Προκύπτει από τον πίνακα ότι δεν υπάρχει σημαντικότητα σε επίπεδο εμπιστοσύνης 0,05. Για τα άλλα δύο ρυθμιστικά διαλύματα δεν παρατηρείται επίσης σημαντικότητα για κανένα μοντέλο γραμμικής συμμεταβολής.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Αποτελέσματα της επεξεργασίας των δεδομένων SEC με την τεχνική της πολλαπλής γραμμικής συσχέτισης με βάση τις δομικές παραμέτρους των ενώσεων και στατιστική εκτίμησή τους με το κριτήριο F (για επίπεδο εμπιστοσύνης 0,05)

pH=6,4

Τεταγμ.	C/O	C/H	N/C	N/O	F _{exp}	F _{tabl}	R ²
-22,6006	-0,1777	39,5762	20,7047	1,1832	1,620422	224	0,86634029
-23,9696	0,2677	39,7699	23,8689		4,236259	19,2	0,86402677
-23,2411		39,7458	21,9948	0,7325	4,30803	>>	0,86598862
-9,17027	-2,37406	31,86205		6,63411	2,610996	>>	0,79660304
18,3909	-1,4788		-14,0484	2,6862	0,2413624	>>	0,26580908
3,77769	-0,29434	13,19857			1,839965	9,55	0,55089355
-20,0202		36,5874	21,0551		8,268473	>>	0,84644477
12,90454	0,48034			-2,51527	0,4183832	>>	0,21809155
2,23078		13,80589		0,18477	1,650804	>>	0,52393099
15,72179	-0,47576		-7,20855		0,5102144	>>	0,25381096
14,39906			-4,24696	-1,12988	0,4754505	>>	0,24067954



ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

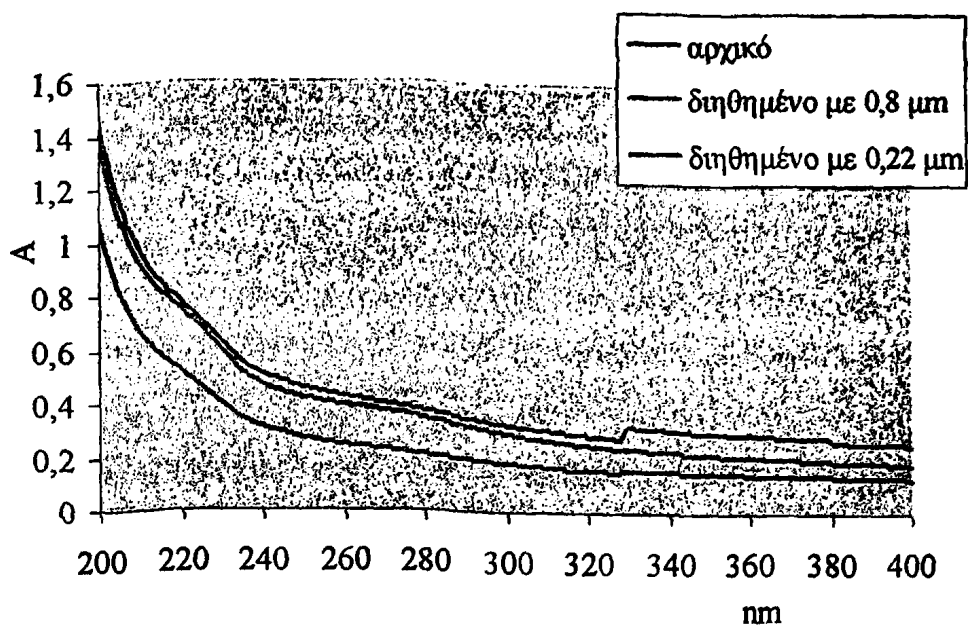
Από τα τελευταία δεδομένα παρατηρείται, ότι η καλύτερη συσχέτιση μεταξύ της συμπεριφοράς έκλουσης και των δομικών παραμέτρων των πεπτιδίων, λαμβάνεται για τη στήλη Sephadex G-25 και τα ρυθμιστικά διαλύματα με pH 6,4 και 9,6 ως κινητή φάση. Το όξινο ρυθμιστικό διάλυμα δεν έδειξε για καμία από τις δύο στήλες και για κανέναν από τους γραμμικούς συνδυασμούς των μεταβλητών σημαντικότητα. Άρα, στην περίπτωση αυτή απορρίπτεται. Υπήρχε, όμως, το μειονέκτημα της αρνητικής απορρόφησης των ενώσεων στα μήκη κύματος που μετρούνται οι απορροφήσεις των ενώσεων (210, 215 ή 220 nm) όταν αυτές εκλούονταν με το όξινο ρυθμιστικό διάλυμα. Για το λόγο αυτό, απορρίπτεται το όξινο ρυθμιστικό διάλυμα και χρησιμοποιείται το ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα, αφού έδειξε θετική απορρόφηση των ενώσεων και σημαντικότητα στο μοντέλο της γραμμικής συμμεταβολής για τη στήλη Sephadex G-25. Έτσι, όσον αφορά την επιλογή της στήλης, εκτιμάται ως καλύτερη η στήλη Sephadex G-25.

3.3.3 Συμπεριφορά των πραγματικών δειγμάτων

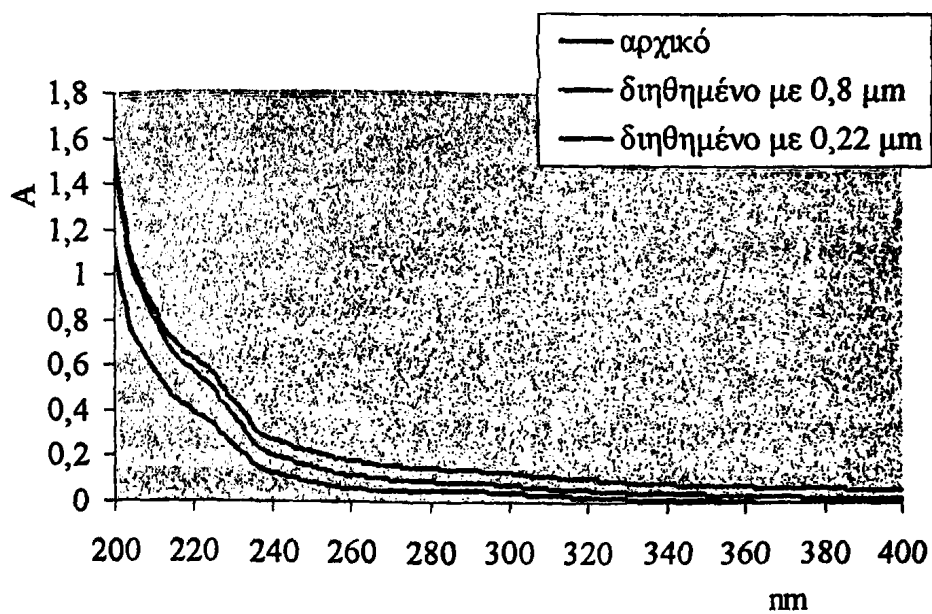
Χρησιμοποιήθηκαν τρία είδη αποβλήτων: αστικά, νοσοκομειακά και βιομηχανικά απόβλητα. Τα χαρακτηριστικά ποιότητάς τους έχουν αναφερθεί ήδη στον πίνακα 1.

Τα UV φάσματα των αραιωμένων αρχικών δειγμάτων, καθώς και τα φάσματα μετά την αναφερόμενη στο πειραματικό μέρος επεξεργασία των δειγμάτων, δίνονται στα σχήματα 3.24, 3.25 και 3.26, αντίστοιχα.

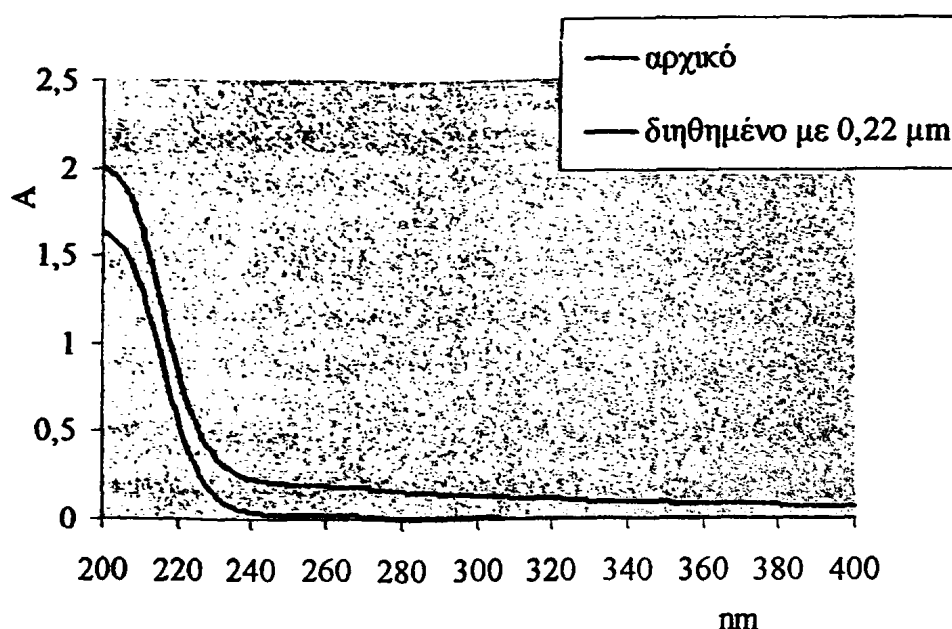




ΣΧΗΜΑ 3.24 : UV φάσματα του αστικού λύματος M29



ΣΧΗΜΑ 3.25 : UV φάσματα του νοσοκομειακού λύματος P7



ΣΧΗΜΑ 3.26 : UV φάσματα του βιομηχανικού αποβλήτου D10

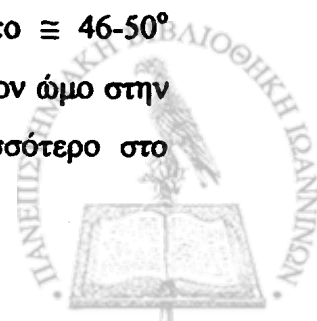
A. Αστικά λύματα

Στο σχήμα 3.27 δίνεται το προφίλ SEC έκλουσης του αστικού λύματος (κωδικός M29), όπου καταγράφεται η απορρόφηση στα 220 και στα 260 nm για καθένα από τα κλάσματα έκλουσης. Στο σχήμα, φαίνεται η ύπαρξη δύο βασικών κορυφών και μιας μικρότερης. Τα φάσματα που αντιστοιχούν στις κορυφές αυτές δίνονται στο σχήμα 3.28.

Η πρώτη κορυφή αντιστοιχεί στις ενώσεις που αποκλείονται από την στήλη, αυτές δηλαδή που έχουν $MB > 5000$. Τα φάσματα των ενώσεων αυτών φαίνεται ότι μπορεί να είναι χουμικού τύπου²⁶.

Η δεύτερη κύρια κορυφή, που είναι και η μεγαλύτερη, αντιστοιχεί σε ενδιάμεσου MB ενώσεις. Το φάσμα των ενώσεων αυτών δείχνει να έχει μέγιστο περίπου στα 205 nm. Οι ενώσεις αυτές φαίνεται να βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση, αφού η απορρόφησή τους φθάνει σχεδόν στις 2 μονάδες.

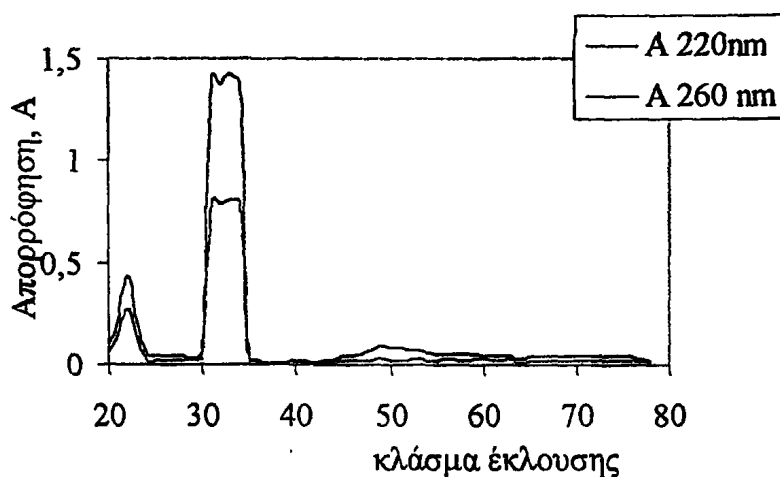
Μία τρίτη κορυφή στο SEC χρωματογράφημα έκλουσης διακρίνεται στο $\cong 46-50^\circ$ κλάσμα. Οι ενώσεις αυτές έχουν ενδιάμεσο MB, ενώ το φάσμα τους έχει τον ώμο στην περιοχή 220-240 nm. Αυτές οι ενώσεις φαίνεται ότι συμβάλλουν περισσότερο στο



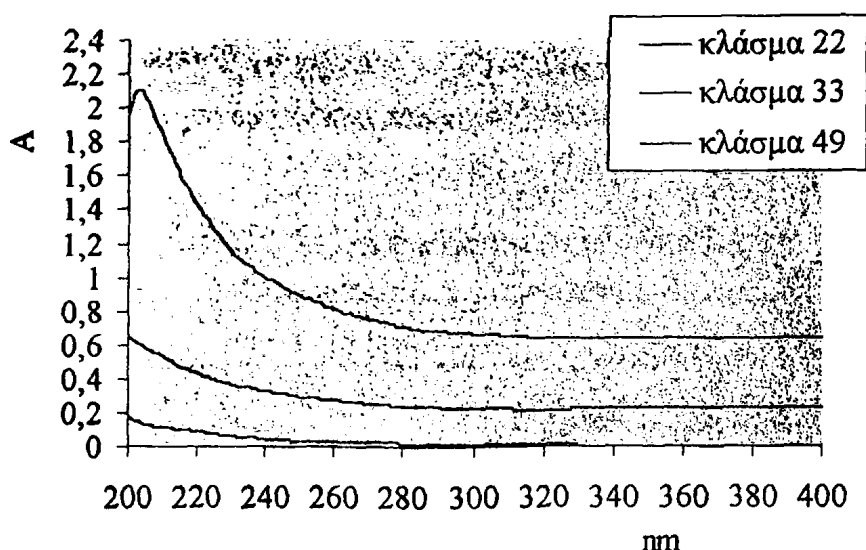
χαρακτηριστικό φάσμα του αρχικού λύματος. Το φάσμα αυτό φαίνεται να μοιάζει με το φάσμα τύπου III (σελ. 26) στην εργασία των Clement ²⁶.

Μετά το 51-52 κλάσμα οι ενώσεις που εκλύονται δίνουν φάσμα που έχει μέγιστο στα 210-215 nm.

Εάν θεωρήσουμε ότι έχουμε ιδανική έκλυση των ενώσεων, θα πρέπει οι ενώσεις μετά το 56-57^ο κλάσμα να έχουν $MB < 1500$. Αν θεωρήσουμε ότι δεν υπάρχει ιδανική έκλυση αλλά ότι βγαίνουν πολύ νωρίτερα, τότε από το 40^ο κλάσμα και έπειτα οι ενώσεις έχουν $MB < 1500$. Στην περίπτωση αυτή, οι ενώσεις με τον ώμο στα 220-230 nm θα έχουν $MB < 1500$. Όσο για τις ενώσεις που βγαίνουν από το 51-52^ο κλάσμα και μετά αυτές θα πρέπει να έχουν $MB < 1500$, είτε πρόκειται για ιδανική έκλυση είτε για μη ιδανική.



ΣΧΗΜΑ 3.27 : SEC-προφίλ του αστικού λύματος



ΣΧΗΜΑ 3.28 : UV φάσματα απορρόφησης των επιμέρους κλασμάτων του SEC-χρωματογραφήματος αστικού λύματος

B. Νοσοκομειακά απόβλητα

Στο σχήμα 3.29 δίνεται το προφίλ SEC έκλυσης του νοσοκομειακού αποβλήτου (κωδικός P7), όπου καταγράφεται η απορρόφηση στα 220 και στα 260 nm για καθένα από τα κλάσματα έκλυσης. Το χρωματογράφημα δείχνει την ύπαρξη τριών βασικών κορυφών. Τα φάσματα που αντιστοιχούν στις κορυφές αυτές δίνονται στο σχήμα 3.30.

Η πρώτη κορυφή αντιστοιχεί στις ενώσεις που αποκλείονται από την στήλη, δηλαδή που έχουν $MB > 5000$. Οι ενώσεις αυτές έχουν φάσματα που είναι τελείως διαφορετικά από εκείνα του αστικού λύματος. Διαφορά μεταξύ των αποβλήτων αυτών παρατηρείται και για τις υπόλοιπες ενώσεις που εκλύονται αργότερα και έχουν συνεπώς $MB < 5000$.

Η δεύτερη κύρια κορυφή αντιστοιχεί στο 47^ο κλάσμα και παρουσιάζει φάσμα με όμο στα 210-220 nm.

Η τρίτη κορυφή στο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο 57^ο κλάσμα. Οι ενώσεις αυτές δεν απορροφούν στα 260 nm αλλά έχουν μία μικρή κορυφή στα 315-320 nm.

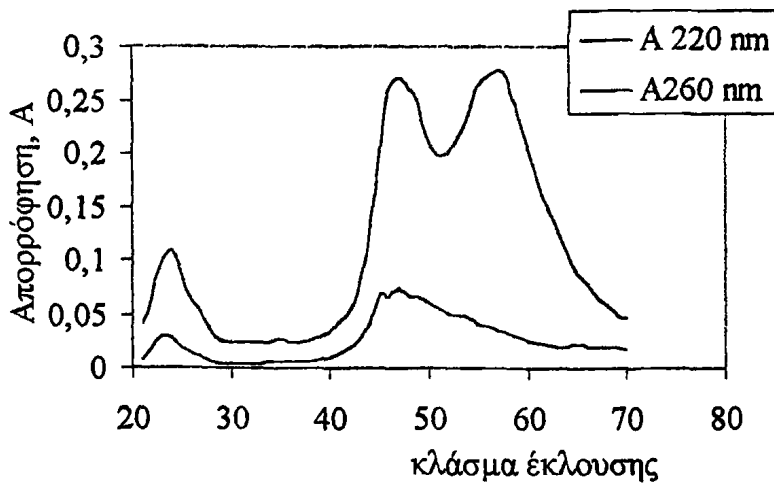
Τα κλάσματα στο δείγμα αυτό έχουν όλα ελαφρώς όμοια φάσματα. Όλα έχουν μέγιστο γύρω στα 205-210 nm. Αυτό που μπορεί να λεχθεί για τις ενώσεις αυτές, ίσως με κάποια



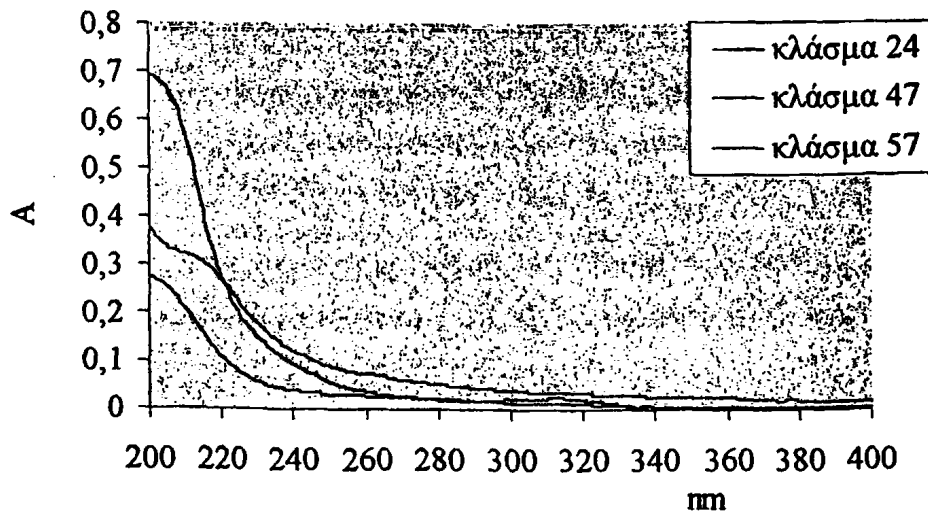
επιφύλαξη ότι δεν έχουν αρωματικό χαρακτήρα, αφού η απορρόφηση από τα 260 nm και έπειτα είναι χαμηλή. Πιθανόν να είναι εστέρες λιπαρών οξέων, φωσφολιπίδια¹⁵⁶.

Το δείγμα αυτό έχει αλκαλικό pH, που σημαίνει ότι οι οργανικές ενώσεις είναι βασικές. Συνεπώς, θα εκλύονται γρηγορότερα από ότι αναμένεται.

Σε σύγκριση με το αστικό λύμα, το προφίλ έκλυσης του νοσοκομειακού αποβλήτου είναι τελείως διαφορετικό. Οι περιεχόμενες ενώσεις στο νοσοκομειακό απόβλητο έχουν μικρότερα MB και παρουσιάζουν διαφορετικά φάσματα από το αστικό λύμα.



ΣΧΗΜΑ 3.29 : SEC-προφίλ του νοσοκομειακού λύματος



ΣΧΗΜΑ 3.30: UV φάσματα απορρόφησης των επιμέρους κλασμάτων του SEC-χρωματογραφήματος νοσοκομειακού λύματος

Γ. Βιομηχανικά απόβλητα

Στο σχήμα 3.31 δίνεται το προφίλ SEC έκλυσης του βιομηχανικού αποβλήτου (κωδικός D10), όπου καταγράφεται η απορρόφηση στα 220 και στα 260 nm για καθένα από τα κλάσματα έκλυσης. Το χρωματογράφημα δείχνει την ύπαρξη δύο βασικών κορυφών. Επειδή η απορρόφηση στο 58° κλάσμα είναι πολύ υψηλή (πάνω από 3 μονάδες απορρόφησης) διαλέγουμε το φάσμα του κλάσματος 64. Τα φάσματα που αντιστοιχούν στις κορυφές αυτές δίνονται στο σχήμα 3.32.

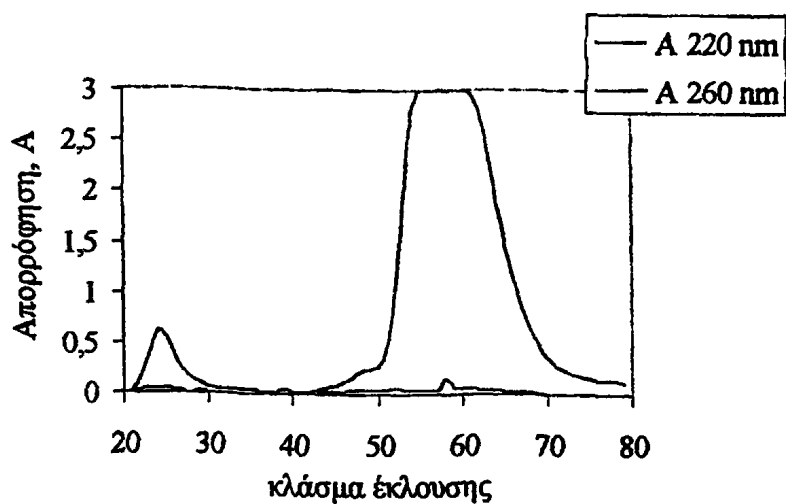
Η πρώτη κορυφή αντιστοιχεί στις ενώσεις που αποκλείονται από την στήλη και έχουν $MB > 5000$. Οι ενώσεις αυτές δίνουν φάσμα πρωτεϊνικού τύπου, με απορρόφηση μεταξύ 230-240 nm και απορρόφηση γύρω στα 280 nm. Οι πρωτεΐνες αυτές θα πρέπει να περιέχουν θρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη.

Οι ενώσεις από το 30° κλάσμα περίπου και έπειτα δεν παρουσιάζουν κάποιο χαρακτηριστικό φάσμα, η απορρόφησή τους ελαττώνεται από τα 210 nm και μετά, ενώ μετά τα 240 nm δείχνουν πολύ χαμηλή απορρόφηση. Μπορεί να είναι φάσματα πρωτεϊνικής φύσης ενώσεων.

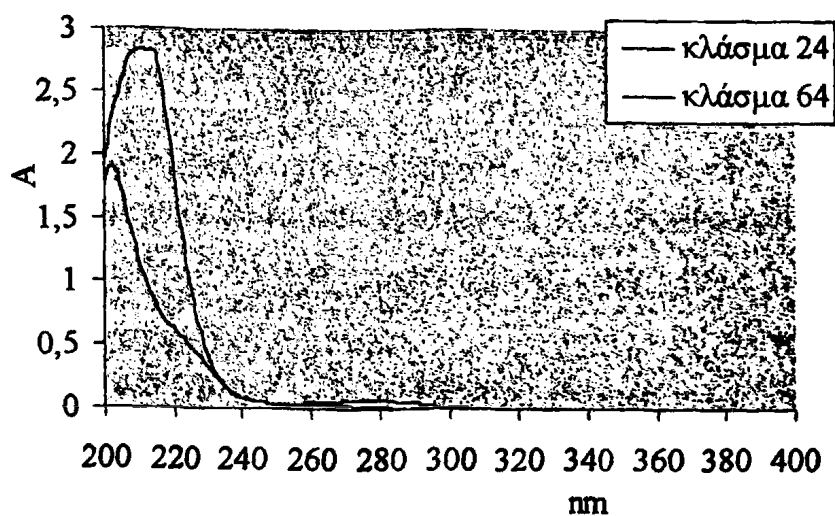
Η δεύτερη κύρια κορυφή στο χρωματογράφημα αντιστοιχεί σε ενώσεις που εκλύονται μεταξύ 50^{ου} και 70^{ου} κλάσματος, οι οποίες πρέπει να έχουν $MB < 1500$ (ιδανική SEC). Οι ενώσεις αυτές δίνουν φάσμα που έχει μέγιστο στα 210-215 nm και πολύ χαμηλή απορρόφηση από τα 240 nm και μετά. Το φάσμα τους μοιάζει με το φάσμα των νιτρικών. Οι ενώσεις αυτές πρέπει να βρίσκονται σε πολύ υψηλή συγκέντρωση, αφού έχουν μέγιστο απορρόφησης πάνω από 3 μονάδες, και μοιάζουν με το φάσμα του αρχικού δείγματος.

Το βιομηχανικό απόβλητο παρουσιάζει διαφορετικό προφίλ έκλυσης από τα άλλα δύο απόβλητα που μελετήθηκαν. Περιέχει μικρού MB ενώσεις σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις οι οποίες και το χαρακτηρίζουν.





ΣΧΗΜΑ 3.31 : SEC-προφίλ του βιομηχανικού αποβλήτου



ΣΧΗΜΑ 3.32 : UV φάσματα απορρόφησης των επιμέρους κλασμάτων του SEC-χρωματογραφήματος βιομηχανικού αποβλήτου.

Συνοψίζοντας για τα τρία αυτά δείγματα, τα μήκη κύματος λ (nm) των κορυφών απορρόφησης που εμφανίζονται στα κλάσματα δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 11: Μήκη κύματος στα μέγιστα απορρόφησης των φασμάτων των κλασμάτων της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους των δειγμάτων

Δείγμα Λύματος	$\lambda_{\text{μεγ}}$	κλάσμα	$\lambda_{\text{μεγ}}$	κλάσμα	$\lambda_{\text{μεγ}}$	κλάσμα	$\lambda_{\text{μεγ}}$
Αστικό	225	22	<200	33	205	49	<200, 220
Βιομηχανικό	203-5	24	203, 225, 275	64	210		
Νοσοκομειακό	222, 290- 300	24	202	47	<200, 215	57	202

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση τις δύο τεχνικές βγαίνουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Τα SEC-χρωματογραφήματα διαφοροποιούνται ανάλογα με την πηγή προέλευσης του δείγματος ως προς τον όγκο κατακράτησης που εκλύονται και ως προς την σχετική ένταση απορρόφησης σε κάθε κλάσμα.
- Τα χρωματογραφήματα αστικού λύματος περιέχουν περισσότερες ενώσεις MB στην περιοχή 3000-4000 Daltons, του νοσοκομειακού λύματος περισσότερες ενώσεις MB στην περιοχή 300-700 Daltons και στο βιομηχανικό απόβλητο ενώσεις MB <500 Daltons.
- Τα κλάσματα που έχουν ενώσεις με MB μεγαλύτερο από 5000 έχουν κορυφές απορρόφησης στα 200-203 nm και 270 nm.
- Τα κλάσματα που έχουν ενώσεις με MB μικρότερο από 5000, έχουν κορυφές απορρόφησης στα 220-225 και 265-275 nm ή μόνο στα 220-225 nm.



- Πιο αναλυτικά, ενώσεις που έχουν MB κοντά στο 1500-1000, έχουν κορυφή απορρόφησης στα 220-225 nm.
- Ενώσεις που έχουν MB μικρότερο από 500 έχουν κορυφή απορρόφησης στα 200-210 nm.

Από τα δεδομένα που ελήφθησαν με τη χρήση της τεχνικής, γίνεται φανερό πως μπορεί να διαπιστωθεί το είδος του λύματος με τη βοήθεια της χρήσης του SEC-χρωματογραφήματος σε συνδυασμό με τα φάσματα των ληφθέντων κλασμάτων.

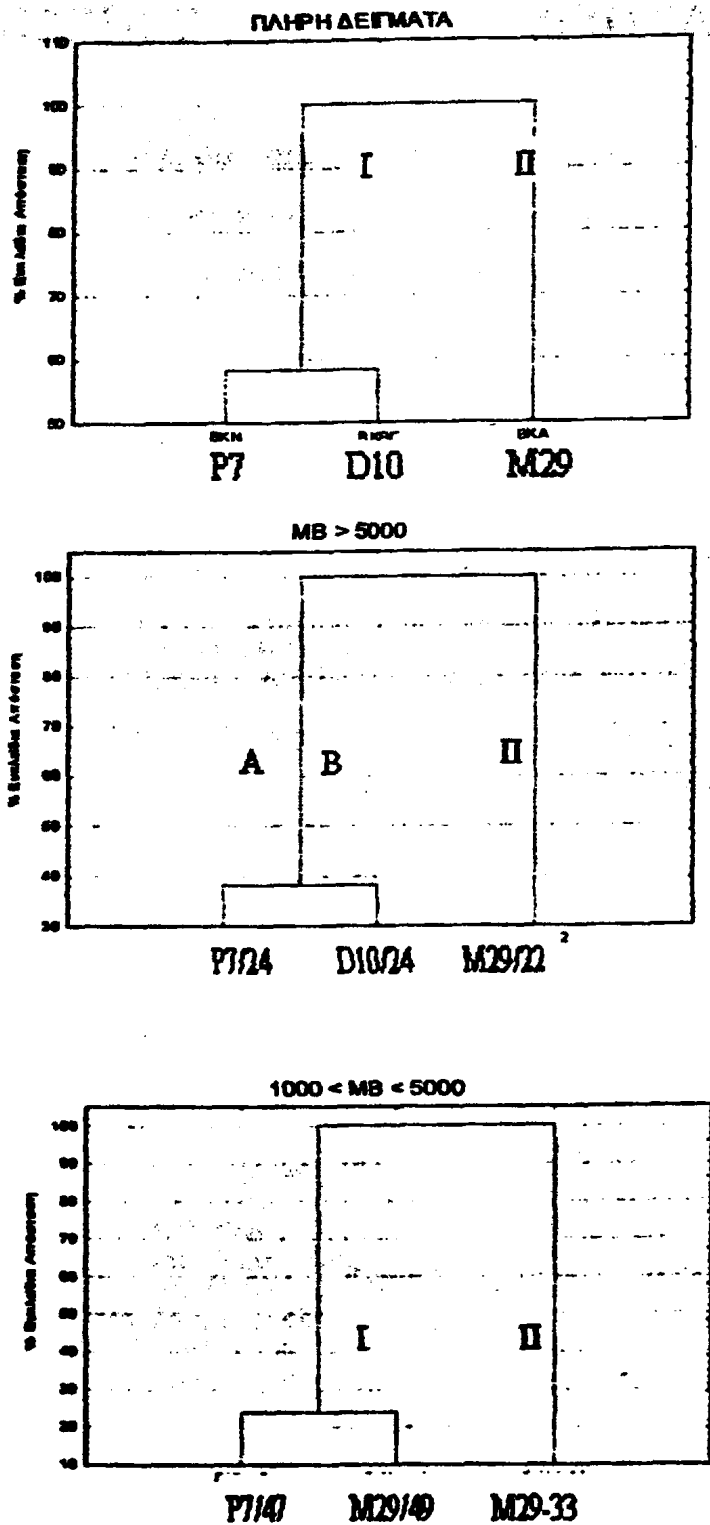
3.3.4 Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων

Ο αριθμός των δειγμάτων είναι πολύ μικρός και δεν αντέχει στατιστική επεξεργασία, παρόλα αυτά γίνεται εφαρμογή της τεχνικής Ανάλυσης κατά Συστάδες των φασμάτων για να πιστοποιηθεί η διαφοροποίηση των φασμάτων των κλασμάτων των διαφορετικών λυμάτων που δεν είναι εμφανής στα πλήρη φάσματα των δειγμάτων. Τα δεδομένα, λοιπόν, των UV φασμάτων των δειγμάτων που προαναφέρθηκαν κατηγοριοποιήθηκαν με τη μέθοδο της ανάλυσης σε συστάδες. Στον πίνακα 12 περιγράφονται τα αποτελέσματα ανά κατηγορία MB, όπως προέκυψαν από το σχήμα 3.33.

ΠΙΝΑΚΑΣ 12: Ανάλυση κατά συστάδες 3 δειγμάτων πριν και μετά εκάστη κλασμάτωση με χρωματογραφία πηκτής

Πλήρη Φάσματα Απόνερων		Φάσματα Κλασμάτων MB>5000			Φάσματα Κλασμάτων 1000<MB<5000		Φάσματα Κλασμάτων MB<1000	
Κατηγορία /Υποκατηγορία								
I	II	I/A	I/B	II	I	II	I	II
P7	M29	P7/24	D10/24	M29/22	M29/49	M29/33	P7/57	D10/64
D10					P7/47			





ΣΧΗΜΑ 3.33 : Διαγράμματα Ανάλυσης κατά συστάδες των φασμάτων των δειγμάτων πλήρων και SEC-κλασμάτων, όπως αυτά αναγράφονται στα επί μέρους ευκανώδια

(Στα κλάσματα με $MB < 1000$ δεν εφαρμόστηκε η ανάλυση σε συστάδες δύο μόνο δειγμάτων)



3.4 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ

Από τις προηγούμενες μελέτες φάνηκε, ότι τα φάσματα των κλασμάτων που προέκυψαν από τους διαχωρισμούς μέσω διαπίδυσης μεμβρανών και ιδίως με τη μέθοδο της SEC-χρωματογραφίας, διαφοροποιούνται στα λύματα, και διαχωρίζονται τα λύματα στις κατηγορίες τους. Αυτό συμβαίνει, επειδή οι επιβαρύνσεις που φέρει το κάθε λύμα διαφοροποιούνται ως προς το μοριακό βάρος των μορίων των, και συνεπώς τα φάσματα των κλασμάτων τους αποκτούν εμφανή χαρακτηριστικά ακόμα και με την απλή οπτική παρατήρηση.

Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στην εύλογη αναζήτηση της διαπίστωσης της κατηγορίας των ενώσεων που κατά κύριο λόγο επιβαρύνουν ένα αστικό λύμα και ένα βιομηχανικό απόβλητο, αφού τα κλάσματά τους εμφανίζουν τόσο μεγάλη διαφορά στο μοριακό βάρος και στα φάσματά τους. Για την αναζήτηση αυτή χρησιμοποιήθηκε η τεχνική κλασμάτωσης της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, όπως λεπτομερώς περιγράφεται στις επόμενες ενότητες.

3.4.1 Προκαταρκτική μελέτη για την εξέταση της ικανότητας της στήλης να κλασματώσει, με κινητή φάση διαφόρων διαλυτών και διαφορετικών μεθόδων έκλουσης, αντιπροσωπευτικό δείγμα αστικού λύματος

Για να εξεταστεί η απόδοση στην κλασμάτωση των συστατικών ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος αστικού λύματος με το είδος μοναδικού διαλύτη ή συστήματος δυαδικού διαλύτη με διάφορες αναλογίες στην κινητή φάση, έγιναν δοκιμές με ισοκρατική έκλυση, καθώς και με βαθμωτή έκλυση και με συνδυασμό των δύο με τη χρήση δυαδικού συστήματος διαλυτών με κλιμάκωση του δεύτερου διαλύτη κατά αυτοσχέδιο προγραμματισμένο τρόπο.

Το δείγμα που δοκιμάστηκε προέρχονταν από την είσοδο του βιολογικού καθαρισμού των αστικών λυμάτων και είχε τις ακόλουθες παραμέτρους ποιότητας:



COD = 900 mg/L
TNK = 90 mg/L
N-NH ₄ = 67 mg/L
N-NO ₃ = 2,2 mg/L
P-PO ₄ = 4,75 mg/L
pH = 7,26
TSS = 1500 mg/L

Το δείγμα υπέστη την προετοιμασία που έχει αναφερθεί στο πειραματικό μέρος και συμπυκνώθηκε περίπου 20 φορές.

Αποτελέσματα προκαταρκτικής μελέτης

A. Ισοκρατική έκλυση

A1. Έκλυση με μοναδικό διαλύτη

Το δείγμα διαχωρίστηκε με ισοκρατική έκλυση με διαλύτες που έχουν διαφορετικές πολικότητες και διαφορετικές ιδιότητες όξινου-βασικού χαρακτήρα. Τα RP-HPLC χρωματογραφήματα με ανίχνευση της απορρόφησης στα 220 nm δίνονται στο σχήμα 3.34 (α-δ). Από το σχήμα φαίνεται, ότι καθένας από τους διαλύτες δίνει ένα διαφορετικό προφίλ έκλυσης μέσα σε χρόνο 10 λεπτά. Όλοι δίνουν πλούσια σε κορυφές χρωματογραφήματα. Το ύδωρ δίνει περισσότερες κορυφές ενώ το THF δίνει τις λιγότερες. Ο αριθμός των ανιχνεύσιμων κορυφών καθώς και το παράθυρο χρόνου που εμφανίστηκε στο καθένα χρωματογράφημα ήταν για:

Το τετραϋδροφουράνιο τρεις ανιχνεύσιμες κορυφές στο παράθυρο χρόνου από 2,80 μέχρι τα 3,70 λεπτά

Το ακετονιτρίλιο τρεις ανιχνεύσιμες κορυφές από 2,50 μέχρι τα 3,20 λεπτά

Τη μεθανόλη τέσσερις ανιχνεύσιμες κορυφές από 2,00 μέχρι τα 3,20 λεπτά

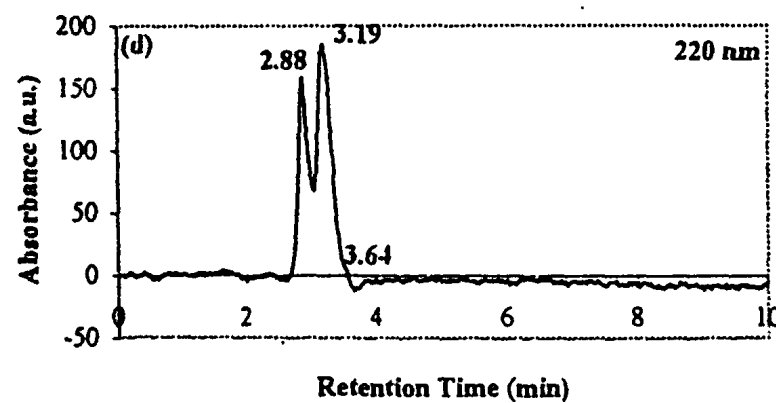
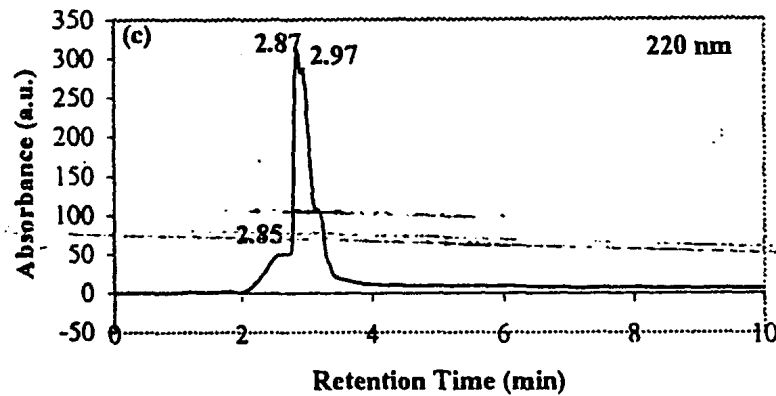
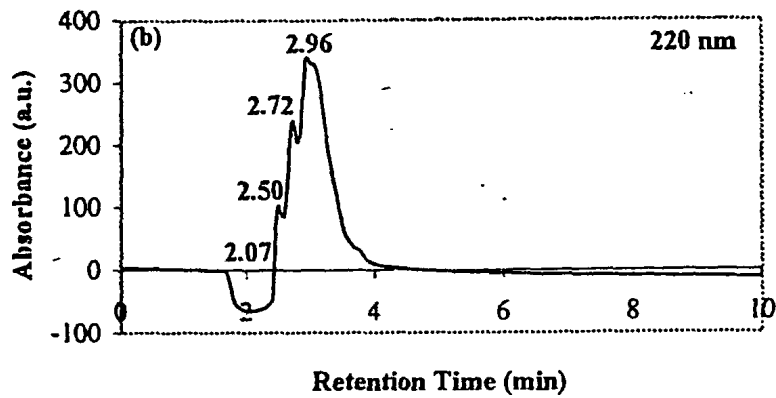
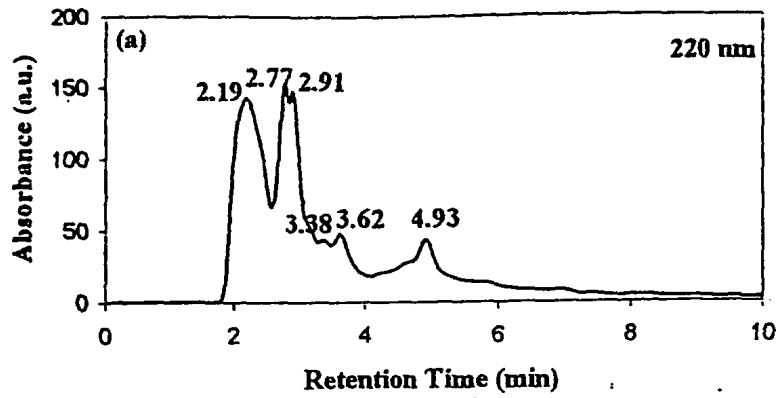
Το ύδωρ έξι ανιχνεύσιμες κορυφές από 2,20 μέχρι τα 5,50 λεπτά

Παρατηρείται, ότι ο αριθμός των κορυφών αυξάνεται όσο μειώνεται η ισχύς του διαλύτη της κινητής φάσης, αφού ο ασθενέστερης ισχύος διαλύτης στη



χρωματογραφία ανάστροφης φάσης που είναι το ύδωρ ¹⁵⁷, δίνει τις περισσότερες κορυφές και ο ισχυρότερης ισχύος διαλύτης που είναι το THF, δίνει τις λιγότερες κορυφές. Επίσης, ο χρόνος έκλουσης μειώνεται με τη μείωση της ισχύος του διαλύτη. Δηλαδή, ο διαλύτης είναι ο αποφασιστικής σημασίας παράγοντας για τον αριθμό των κορυφών και το σχήμα του χρωματογραφήματος. Το ύδωρ δείχνει να έχει την καλύτερη διαχωριστική ικανότητα σε σχέση με τους άλλους διαλύτες. Συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα με εκλουστικό υγρό τη μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο που έχουν παρόμοιες πολικότητες, βλέπουμε ότι τα πλάτη των κορυφών και οι χρόνοι κατακράτησης είναι παρόμοιοι, αλλά το σχήμα των κορυφών είναι διαφορετικό. Αυτό συμβαίνει γιατί η μεθανόλη είναι ισχυρότερος δότης πρωτονίων (δέκτης ζεύγους ηλεκτρονίων) από το ακετονιτρίλιο (απρωτικός διαλύτης). Το THF τέλος, δίνει σχετικά φαρδιές κορυφές. Το πλάτος των κορυφών αυξάνει με την αύξηση της ισχύος του διαλύτη.





ΣΧΗΜΑ 3.34: Χρωματογραφήματα ισοκρατικής έκλουσης αστικού λύματος με μοναδικό διαλύτη (α) H_2O , (β) $MeOH$, (γ) $MeCN$ και (δ) THF



A2. Έκλυση με δυαδικό σύστημα διαλυτών

Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα δυαδικά μίγματα: τετραϋδροφουράνιο-ύδωρ, τετραϋδροφουράνιο-ακετονιτρίλιο, μεθανόλη-ύδωρ, ακετονιτρίλιο-ύδωρ και ακετονιτρίλιο-μεθανόλη σε διάφορες αναλογίες.

i) Μίγματα THF-H₂O

Τα χρωματογραφήματα των μιγμάτων αυτών δίνονται στο σχήμα 3.35. Στον Πίνακα 13 δίνονται οι χρόνοι κατακράτησης, η καθαρότητα κάθε κορυφής στα χρωματογραφήματα με ανίχνευση της απορρόφησης στα 260 και στα 280 nm για όλες τις αναλογίες δυαδικού συστήματος διαλυτών THF-H₂O που εξετάσθηκαν στην παρούσα εργασία. Δεν λαμβάνονται υπόψη τα χρωματογραφήματα στα 220 nm αφού το THF απορροφάει κάτω από τα 230 nm.

Με 100 % THF εμφανίζονται όπως ειπώθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, τέσσερις κορυφές, από τις οποίες οι δύο έχουν υψηλή καθαρότητα (στα 3,19 και στα 3,64 min) και οι άλλες δύο χαμηλή καθαρότητα (στα 2,88 και στα 3,49 min).

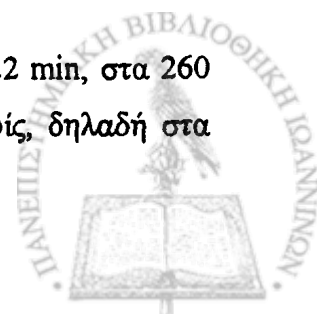
Προσθέτοντας 10 % ύδωρ, μειώνεται ο αριθμός των κορυφών σε τρεις, από τις οποίες η τελευταία, που έχει πολύ χαμηλή καθαρότητα εμφανίζεται μόνο στα χρωματογραφήματα με ανίχνευση απορρόφησης στα 280 nm. Οι δύο πρώτες που βγαίνουν στα 2,69 και 2,96 min έχουν αρκετά υψηλές καθαρότητες.

Με επιπλέον ύδωρ έως 30 %, εμφανίζονται πάλι τρεις κορυφές στα 2,36, 2,65 και 3,05 min, εκ των οποίων μόνο η τελευταία έχει κάπως καλή καθαρότητα.

Με 50 % περιεκτικότητα σε ύδωρ, αυξάνεται πάλι ο αριθμός των κορυφών σε πέντε. Στα 2,35, 2,68, 2,84, 3,10 και 3,36 min όλες με υψηλές καθαρότητες. Μεγαλύτερη ένταση έχει η κορυφή στα 2,35 min.

Με 70 % περιεκτικότητα σε ύδωρ, ο αριθμός των κορυφών παραμένει ο ίδιος. Στα 2,42, 2,74, 3,04, 3,16 και 3,57 min και έχουν όλες υψηλές καθαρότητες. Μεγαλύτερη ένταση έχει η κορυφή στα 2,42 min. Φαίνεται ότι οι κορυφές στα 2,35 και 2,68 min του προηγούμενου μίγματος εμφανίζονται με το μίγμα αυτό λίγο αργότερα στα 2,42 και 2,74 min.

Με 90 % ύδωρ, η πρώτη κορυφή εμφανίζεται πολύ νωρίτερα στα 2,22 min, στα 260 nm έχοντας υψηλή καθαρότητα. Η δεύτερη κορυφή επίσης πιο νωρίς, δηλαδή στα

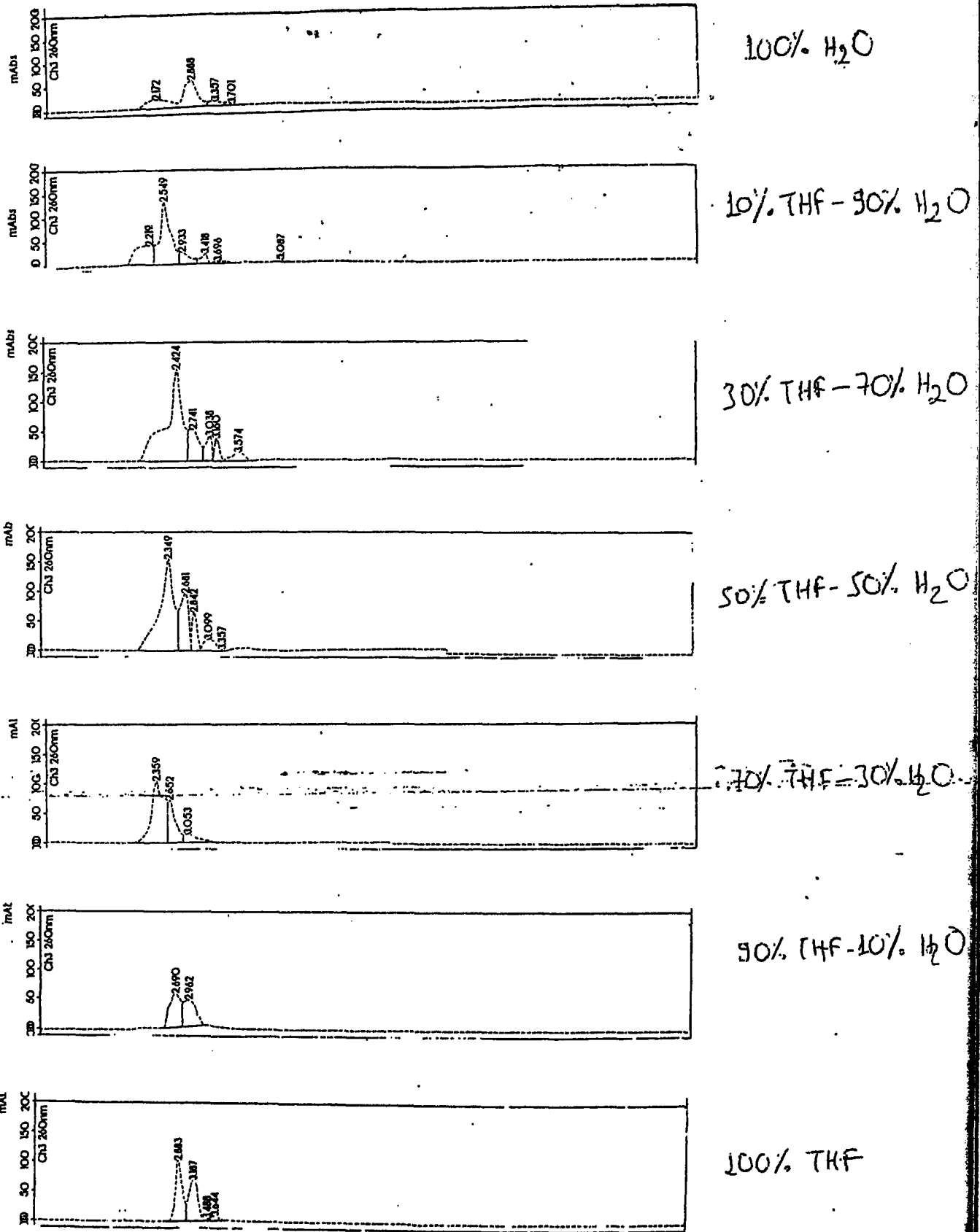


2,55 min. Πιθανόν, η κορυφή στα 2,42 min του προηγούμενου μίγματος χωρίστηκε στις δύο κορυφές στα 2,22 και 2,55 min αφού το άθροισμα των απορροφήσεων των φαίνεται να δίνει την πρώτη. Οι άλλες εμφανίζονται στα 2,93, 3,42, 3,70 και 5,09 min και έχουν αρκετά υψηλές καθαρότητες.

Με αποκλειστικά υδατική κινητή φάση, παίρνουμε έξι κορυφές (φαίνονται στον πίνακα 3). Η πρώτη στα 2,19 min είναι η ίδια με την 2,22 min στο προηγούμενο μίγμα και έχει υψηλή καθαρότητα. Η δεύτερη κορυφή στα 2,77 min, που είναι και η μεγαλύτερη, έχει πολύ υψηλή καθαρότητα πρέπει να αντιστοιχεί στην κορυφή στα 2,55 min του προηγούμενου μίγματος. Η τρίτη κορυφή στα 2,90 min πρέπει να αντιστοιχεί στην κορυφή στα 2,93 min του προηγούμενου μίγματος. Οι τρεις τελευταίες κορυφές που εμφανίζονται στα 3,37, 3,62 και 4,93 min έχουν πολύ υψηλή καθαρότητα πρέπει να αντιστοιχούν στις τελευταίες κορυφές του προηγούμενου μίγματος.

Συμπεραίνεται, ότι η βασική κορυφή στο 100 % ύδωρ (2,77 min) μετατοπίζεται και εμφανίζεται πιο νωρίς με 10 % THF (2,55 min), ενώ οι τελευταίες βγαίνουν λίγο πιο αργά. Με 100 % THF οι κορυφές των πολικών ενώσεων καθυστερούν να εκλουστούν, ενώ προσθέτοντας νερό παρασύρονται και εμφανίζονται νωρίτερα, ταυτόχρονα ξεχωρίζουν και οι λιγότερο πολικές που καθυστερούν να εμφανιστούν με διαλύτη νερό. Για τα φάσματα πρέπει να σημειωθεί ότι το THF έχει στο UV cut-off 230 nm (δηλαδή, απορροφά σε μήκη κύματος μικρότερα από 230 nm). Σε όσο μικρότερο ποσοστό βρίσκεται στην κινητή φάση, τόσο πιο καθαρά είναι τα φάσματα των ενώσεων. Αυτό που πρέπει να τονιστεί επίσης είναι ότι με κινητή φάση το THF σε μίγμα με νερό, δεν παίρνουμε σε κανένα μίγμα μία μεμονωμένη κορυφή, δηλαδή δεν εκλούνται όλες οι ενώσεις μαζί, όπως γίνεται με κάποια από τα μίγματα MeOH-H₂O και MeCN-H₂O, όπως θα δούμε παρακάτω.





ΣΧΗΜΑ 3.35: Χρωματογραφήματα ισοκρατικής έκλουσης του ασπικού λύματος με δυαδικά μίγματα THF-ύδατος σε διαφορετικές αναλογίες.



ΠΙΝΑΚΑΣ 13: Χρόνος κατακράτησης και καθαρότητα των κορυφών στα χρωματογραφήματα του αστικού λύματος που ελήφθησαν στα μήκη κύματος απορρόφησης 260 και 280 nm με το δυαδικό σύστημα διαλυτών THF-H₂O

% THF	t_R	Καθαρότητα	t_R	Καθαρότητα
	260 nm		280 nm	
100	2.88	0.4377	2.90	0.3258
	3.19	0.9962	3.22	0.8911
	3.49	0.3866		
	3.64	0.9678		
90	2.69	0.9415	2.69	0.8654
	2.96	0.9768	2.97	0.9480
			3.42	0.2950
70	2.36	0.0427	2.36	0.0562
	2.65	0.6305	2.65	0.6862
	3.05	0.8767	3.09	0.8918
50	2.35	0.9627	2.35	0.9469
	2.68	0.9902	2.69	0.9919
	2.84	0.9999		
	3.10	0.9975	3.17	0.9975
	3.36	0.9506		
30	2.42	0.9977	2.42	0.9975
	2.74	0.9785	2.74	0.9301
	3.04	0.9885	3.04	0.9936
	3.16	0.9879		
	3.57	0.8989	3.64	0.9806
10	2.22	0.9653		
	2.55	0.9804	2.55	0.9976
	2.93	0.7699	2.92	0.9618
	3.42	0.8804	3.42	0.9465
	3.70	0.8146	4.30	0.3468
	5.09	0.9509	5.08	0.7805
0	2.17	0.9794	2.21	0.9895
	2.89	0.6067	2.89	0.0551
	3.36	0.9955		
	3.70	0.9948		



ii) Μίγματα THF-ακετονιτρίλιου

Τα χρωματογραφήματα δίνονται στο σχήμα 3.36. Στον Πίνακα 14 δίνεται ο χρόνος κατακράτησης των κορυφών και η καθαρότητα κάθε κορυφής στα χρωματογραφήματα με απορρόφηση στα 260 και στα 280 nm για τα μίγματα THF-ακετονιτρίλιου. Δεν λαμβάνουμε υπόψη τα χρωματογραφήματα στα 220 nm, αφού το THF απορροφά κάτω από τα 230 nm.

Με 100 % THF ως εκλουστικό εμφανίζονται τέσσερις κορυφές, δύο με υψηλή καθαρότητα (3,19 και 3,64 min) και οι δύο με χαμηλή καθαρότητα (2,88 και 3,49 min).

Με 10 % MeCN στην κινητή φάση εμφανίζονται τρεις κορυφές, στα 2,90 min με πολύ χαμηλή καθαρότητα, στα 3,21 min και στα 3,58 min με αρκετά καλές καθαρότητες.

Με 30 % MeCN εμφανίζονται πάλι τρεις κορυφές, η πρώτη στα 2,91 min εξακολουθώντας να έχει πολύ χαμηλή καθαρότητα, και οι άλλες στα 3,09 και στα 3,31 min. Οι δύο τελευταίες κορυφές δεν έχουν καλή καθαρότητα.

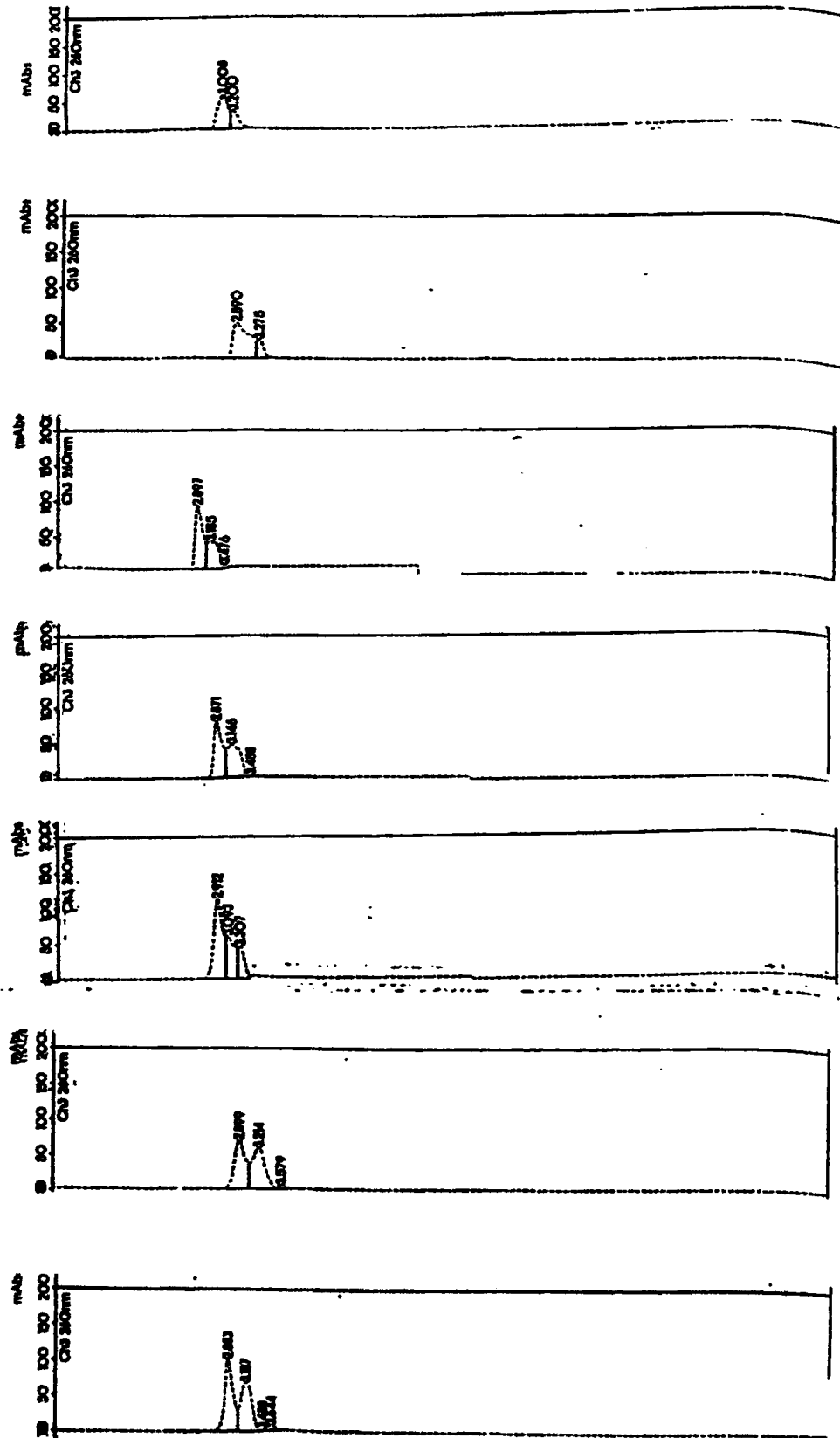
Με ίσο ποσοστό MeCN- THF παραμένει και πάλι σταθερός ο αριθμός των κορυφών. Η πρώτη εμφανίζεται στα 2,87 min με πολύ χαμηλή καθαρότητα, όπως και στα προηγούμενα μίγματα διαλυτών. Οι άλλες βγαίνουν στα 3,15 και στα 3,49 min με σχετικά καλή καθαρότητα και αυτές.

Με 70 % MeCN αυξάνεται κατά ένα ο αριθμός των κορυφών. Η πρώτη κορυφή που εμφανίζεται και πάλι στα 2,90 min έχει πολύ υψηλή καθαρότητα. Η κορυφή στα 3,19 min παραμένει, όπως και η κορυφή στα 3,48 min. Η νέα κορυφή είναι στα 3,29 min.

Με 90 % MeCN μειώνονται σε δύο οι κορυφές, που εμφανίζονται στα 2,89 και στα 3,27 min με αρκετά υψηλές καθαρότητες.

Το ακετονιτρίλιο δίνει δύο κορυφές, που απορροφούν στα 260 και 280 nm, μία στα 3,01 min και άλλη στα 3,20 min. Η βασική κορυφή που εμφανίζεται στα 2,97 min και απορροφά στα 220 nm (σχήμα 3.34γ) έχει υψηλή καθαρότητα και πολύ υψηλή απορρόφηση. Συμπερασματικά, το THF σε μίγμα με το MeCN στις περισσότερες αναλογίες δεν μεταβάλλουν σημαντικά τον χρόνο έκλουσης των ενώσεων. Αυτό είναι αναμενόμενο αφού από μόνοι τους οι διαλύτες δίνουν τρεις κορυφές. Πιθανόν να αλληλεπιδρούν συνεργιστικά με τις διαλυτές ενώσεις των δειγμάτων. Σύμφωνα με τον Snyder, οι δύο αυτοί διαλύτες ανήκουν σε ομάδες που καλύπτονται κατά κάποιο ποσοστό μεταξύ τους¹⁵⁸.





100% MeCN

10% THF - 90% MeCN

30% THF - 70% MeCN

50% THF - 50% MeCN

70% THF - 30% MeCN

90% THF - 10% MeCN

100% THF

ΣΧΗΜΑ 3.36: Χρωματογραφήματα ισοκρατικής έκλουσης του αστικού λύματος με διαδικό σύστημα διαλυτών THF-MeCN σε διαφορετικές αναλογίες



ΠΙΝΑΚΑΣ 14: Χρόνος κατακράτησης και καθαρότητα των κορυφών στα χρωματογραφήματα του αστικού λύματος που ελήφθησαν στα μήκη κύματος απορρόφησης 260 και 280 nm με το δυαδικό σύστημα διαλυτών THF-ακετονιτριλίου

% THF	t_R	Καθαρότητα	t_R	Καθαρότητα
	260 nm		280 nm	
100	2.88	0.4377	2.90	0.3258
	3.19	0.9962	3.22	0.8911
	3.49	0.3866		
	3.64	0.9678		
90	2.90	0.0920	2.91	0.0473
	3.21	0.9592	3.22	0.7600
	3.58	0.8602		
70	2.91	0.0994	2.92	0.0702
	3.09	0.6594	3.09	0.6292
	3.31	0.8338	3.31	0.2797
50	2.87	0.0505	2.89	0.6653
	3.15	0.8947	3.15	0.9134
	3.49	0.6644		
30	2.90	0.9852	2.91	0.9952
	3.19	0.7106	3.19	0.9436
	3.48	0.9827	3.29	0.8352
10	2.89	0.9674	2.93	0.9758
	3.27	0.7988	3.29	0.8132
0	3.01	0.9977	3.02	0.9974
	3.20	0.9586	3.19	0.9509



Ισοκρατική έκλυση με μίγματα διαλυτών MeOH-H₂O, MeCN-H₂O και MeCN-MeOH και εφαρμογή της Ανάλυσης σε συστάδες

Για να εξεταστεί η επίδραση της φύσης του διαλύτη και της σύστασης του εκλουστικού στο χρόνο κατακράτησης και το σχήμα των κορυφών, μελετήθηκε η διαφορετικότητα των φασματικών χαρακτηριστικών των κορυφών των χρωματογραφημάτων που ελήφθησαν από την ισοκρατική έκλυση των συστατικών του δείγματος με εκλουστικό υγρό τα δυαδικά μίγματα διαλυτών από διαφορετικές αναλογίες με την ανάλυση σε συστάδες¹⁵⁹. Από τις κορυφές πήραμε μόνο εκείνες που ελήφθησαν από συνολικά 17 χρωματογραφήματα των μιγμάτων μεθανόλης-ύδατος, ακετονιτρίλιου-ύδατος και ακετονιτρίλιου-μεθανόλης. Τα μίγματα με το THF αποκλείστηκαν καθώς το THF δεν έδειχνε τις περισσότερες φορές καθαρά φάσματα, επειδή το φασματικό όριο αποκοπής είναι αρκετά υψηλό στην περιοχή UV, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Έτσι, εμφανίστηκαν συνολικά 80 κορυφές (σήματα): (α) οι κορυφές που εμφανίζονται στον ίδιο χρόνο στα χρωματογραφήματα και στα τρία μήκη κύματος, που θεωρήθηκε ότι είναι πραγματικές κορυφές, (β) οι κορυφές που εμφανίζονται στα δύο από τα τρία μήκη κύματος ή μόνο στο ένα μήκος κύματος που σημαίνει ότι μόνο σε αυτό απορροφά. Οι μόνες κορυφές που δεν συμπεριλαμβάνονται στο δενδρόγραμμα είναι από το μίγμα 50%-50% (MeCN-H₂O) λόγω έλλειψης δεδομένων, και από το μίγμα 30%-70% (MeCN-H₂O) τις δύο τελευταίες, αφού έδειξαν πολύ χαμηλή ένταση.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν δίνονται στο σχήμα 3.37. Η παράμετρος D_{link} είναι η διαφορά μεταξύ των φασμάτων στον n -διάστατο χώρο, ενώ η παράμετρος D_{link}/D_{max} είναι ο λόγος της D_{link} προς τη μέγιστη διαφορά D_{max} που έχει ληφθεί από διαφορετικά φάσματα.

Με W, M και A συμβολίζεται ο διαλύτης ύδωρ, μεθανόλη και ακετονιτρίλιο, αντίστοιχα.

Τα δυαδικά μίγματα ύδατος-μεθανόλης συμβολίζονται με WM, όπου:

- WM1 (10% W-90% M),
- WM2 (30% W-70% M),
- WM3 (50% W-50% M),
- WM4 (70% W-30% M) και
- WM5 (90% W-10% M).



Τα δυαδικά μίγματα ύδατος-ακετονιτρίλιου συμβολίζονται με WA,
 WA1 (10% W-90% A),
 WA2 (30% W-70% A),
 WA3 (50% W-50% A),
 WA4 (70% W-30% A) και
 WA5 (90% W-10% A)

Τα δυαδικά μίγματα ακετονιτρίλιου-μεθανόλης συμβολίζονται με AM,
 AM1 (90% A-10% M),
 AM2 (70% A-30% M),
 AM3 (50% A-50% M),
 AM4 (30% A-70% M) και
 AM5 (10% A-90% M).

Τα σύμβολα a, b, c, d, e, f και g είναι ο αριθμός των σημάτων (κορυφών) από την έκλυση με καθένα από τα μίγματα.

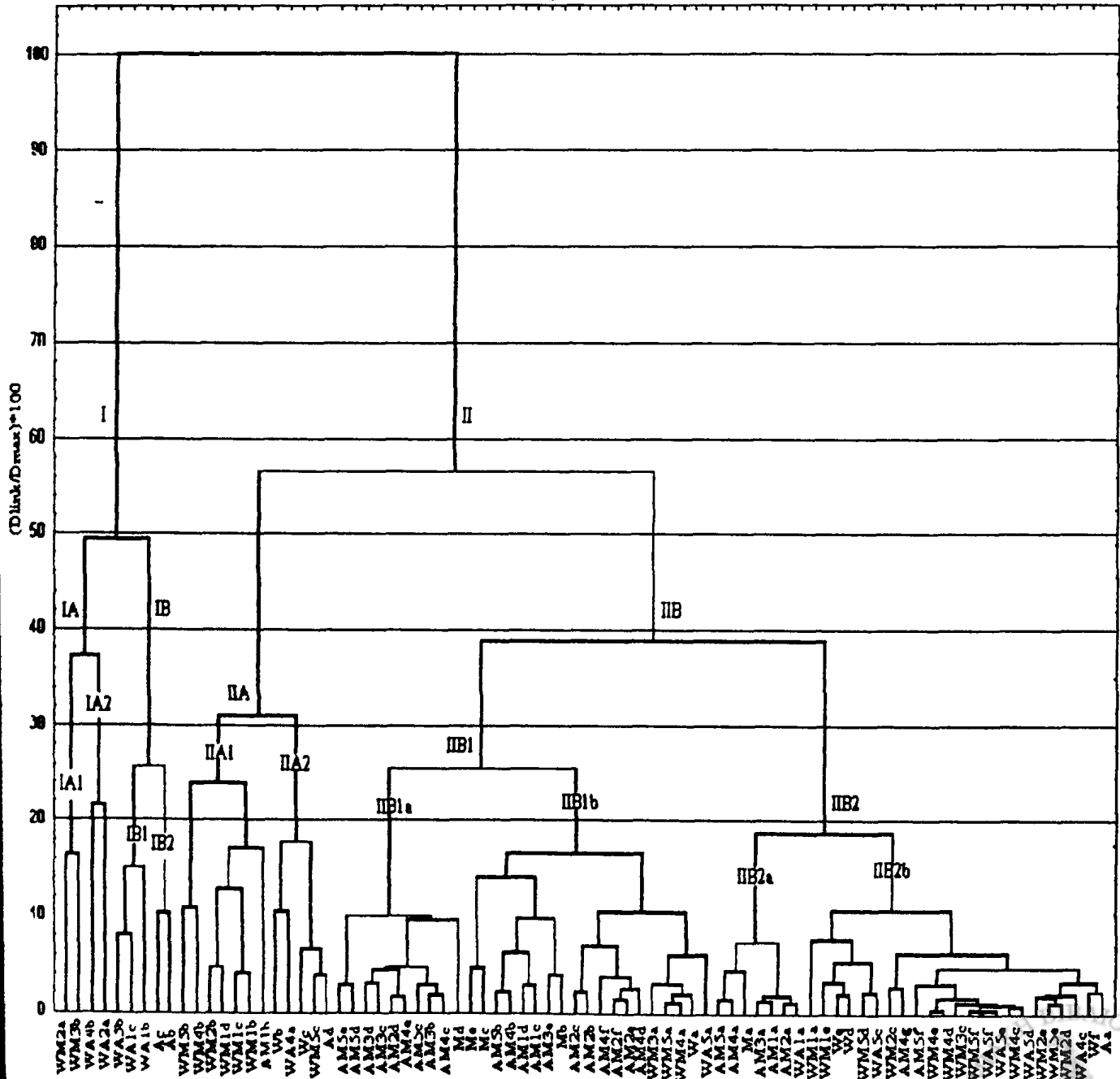
Σύμφωνα με το σχήμα 3.37, οι διαφορές που υπάρχουν χωρίζουν τα φάσματα στις ομάδες I και II (κύριες ομάδες). Σε μικρότερο βαθμό οι φασματικές διαφορές χωρίζουν τις δύο κύριες ομάδες στις υποομάδες IA, IB και IIA, IIB. Περαιτέρω διαίρεση των υποομάδων, δίνει τις IA1, IA2, IB1, IB2, IIA1, IIA2, IIB1 και IIB2. Διαίρεση κάτω από το επίπεδο αυτό θεωρείται μικρότερης σημασίας.

Όταν υπάρχει διαφορά μεγαλύτερη από 25 στον κατακόρυφο άξονα, θεωρείται ότι διαφέρουν τα φάσματα των ενώσεων. Θα δούμε τα αποτελέσματα για καθένα από τα μίγματα ξεχωριστά.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 15, κάποιες ομάδες όπως η IB1 περιέχουν κορυφές πολύ χαμηλής καθαρότητας, οι ομάδες IA1, IA2, IB2, IIA1 έχουν στο σύνολό τους μη καθαρές κορυφές στα 220 nm, ενώ οι ομάδες IIB1, IIA2 και IIB2 περιέχουν κορυφές με υψηλή καθαρότητα στα 220 nm. Συνήθως, καθαρές κορυφές στις ομάδες είναι αυτές που εκλύονται με νερό.



ΣΧΗΜΑ 3.37 : Διάγραμμα Ανάλυσης κατά Συστάδες των φασμάτων HPLC-κορυφών αστικού λύματος



ΠΙΝΑΚΑΣ 15: Φασματική καθαρότητα των χρωματογραφικών κορυφών του αστικού λύματος που ταξινομούνται σε διαφορετικές υποομάδες

Ομάδα	Ολικός αριθμός κορυφών	Αριθμός κορυφών υψηλής καθαρότητας	Αριθμός κορυφών χαμηλής καθαρότητας
ΠΒ2b	23	12	11
ΠΒ2a	7	7	-
ΠΒ1b	19	12	7
ΠΒ1a	10	5	5
ΠΑ2	5	4	1
ΠΑ1	7	3	4
ΙΒ2	2	1	1
ΙΒ1	3	-	3
ΙΑ2	2	1	1
ΙΑ1	2	1	1
Σύνολο	80	46	34



iii) Μίγματα μεθανόλης-ύδατος

Το δείγμα εκλούσθηκε με διαφορετικές αναλογίες μεθανόλης-ύδατος, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.38. Τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 16, όπου δίνεται ο χρόνος κατακράτησης και η καθαρότητα κάθε κορυφής που εμφανίσθηκε στα χρωματογραφήματα με τον ανιχνευτή να μετρά την απορρόφηση στα 220, 260 και στα 280 nm.

Στον πίνακα 17 φαίνεται η μεταβολή στο χρόνο κατακράτησης των διαφορετικών φασματικών υποομάδων με την αύξηση της μεθανόλης σε μίγμα με το ύδωρ. Από τον πίνακα φαίνεται ότι μερικές ενώσεις που σχετίζονται με κάποιες φασματικές ομάδες μετακινούνται σε μικρότερους χρόνους κατακράτησης, ενώ παράλληλα άλλες σε μεγαλύτερους καθώς αλλάζει το εκλουστικό από υψηλής πολικότητας διαλύτη σε χαμηλότερης πολικότητας. Αναλυτικά παρατηρούμε τα εξής:

Όταν έχουμε 100 % μεθανόλη, προκύπτουν πέντε συνολικά κορυφές. Από τις πέντε μόνον η πρώτη που εμφανίζεται πιο νωρίς στα 2,05 min ανήκει στην ΠΒ2, ενώ οι υπόλοιπες τέσσερις ανήκουν στην ΠΒ1. Οι τρεις μεγαλύτερες ανιχνεύσιμες κορυφές (2,50, 2,72 και 2,96 min) σχηματίζονται σε μία φαρδιά ταινία απορρόφησης που απλώνεται από 2,50 μέχρι τα 3,25 min. Όλες οι κορυφές είναι φαρδιές και απορροφούν σχετικά έντονα στα 220 nm και πολύ λιγότερο στα 280 nm.

Όταν προστίθεται 10 % ύδωρ στην κινητή φάση, από τις πέντε κορυφές η πρώτη παραμένει στην ΠΒ2 και στον ίδιο περίπου χρόνο (2,01 min) με τη χρήση διαλύτη νερού. Οι επόμενες τρεις ανήκουν στην ΠΑ1. Η τελευταία κορυφή στα 3,57 min ανήκει στην ΠΒ2.

Αύξηση σε 30 % της περιεκτικότητας σε ύδωρ, φέρνει τις τρεις κορυφές μεταξύ 2,70 και 3,20 min, πιο κοντά μεταξύ τους και εξαφανίζει την κορυφή στα 2,02 min. Οι τρεις τελευταίες κορυφές που έχουν χαμηλή απορρόφηση εκλούνται σε μεγαλύτερους χρόνους και ανήκουν στην ομάδα ΠΒ2. Η πρώτη κορυφή στα 2,73 ανήκει στην ΙΑ1 και η δεύτερη στα 2,95 στην ομάδα ΠΑ1.

Αύξηση σε 50 % της περιεκτικότητας σε ύδωρ, όπου αναπτύσσεται η υψηλότερη πίεση στον χρωματογράφο ¹⁵⁷, δίνει τρεις κορυφές. Η μεγαλύτερη κορυφή είναι στα 2,73 min ανήκει στην ομάδα ΙΑ1 και πιθανόν να οφείλεται στην ολίσθηση των



κορυφών στα 2,73 min και 2,95 min που παρατηρήθηκε στην έκλυση με 30% νερό, με απορρόφηση που είναι το άθροισμα των δύο. Μία πολύ μικρή κορυφή στα 2,39 min (ομάδα ΠΒ1) και μία άλλη κορυφή στα 3,82 min με πολύ χαμηλή απορρόφηση (ομάδα ΠΒ2).

Με ποσοστό 70% ύδωρ στην κινητή φάση αυξάνεται ο αριθμός των κορυφών σε πέντε. Η βασική κορυφή στα 2,73 min ανήκει στην ομάδα ΠΑ1. Η πρώτη κορυφή στα 2,19 min ανήκει στην ΠΒ1, ενώ οι τρεις τελευταίες ανήκουν στην ομάδα ΠΒ2.

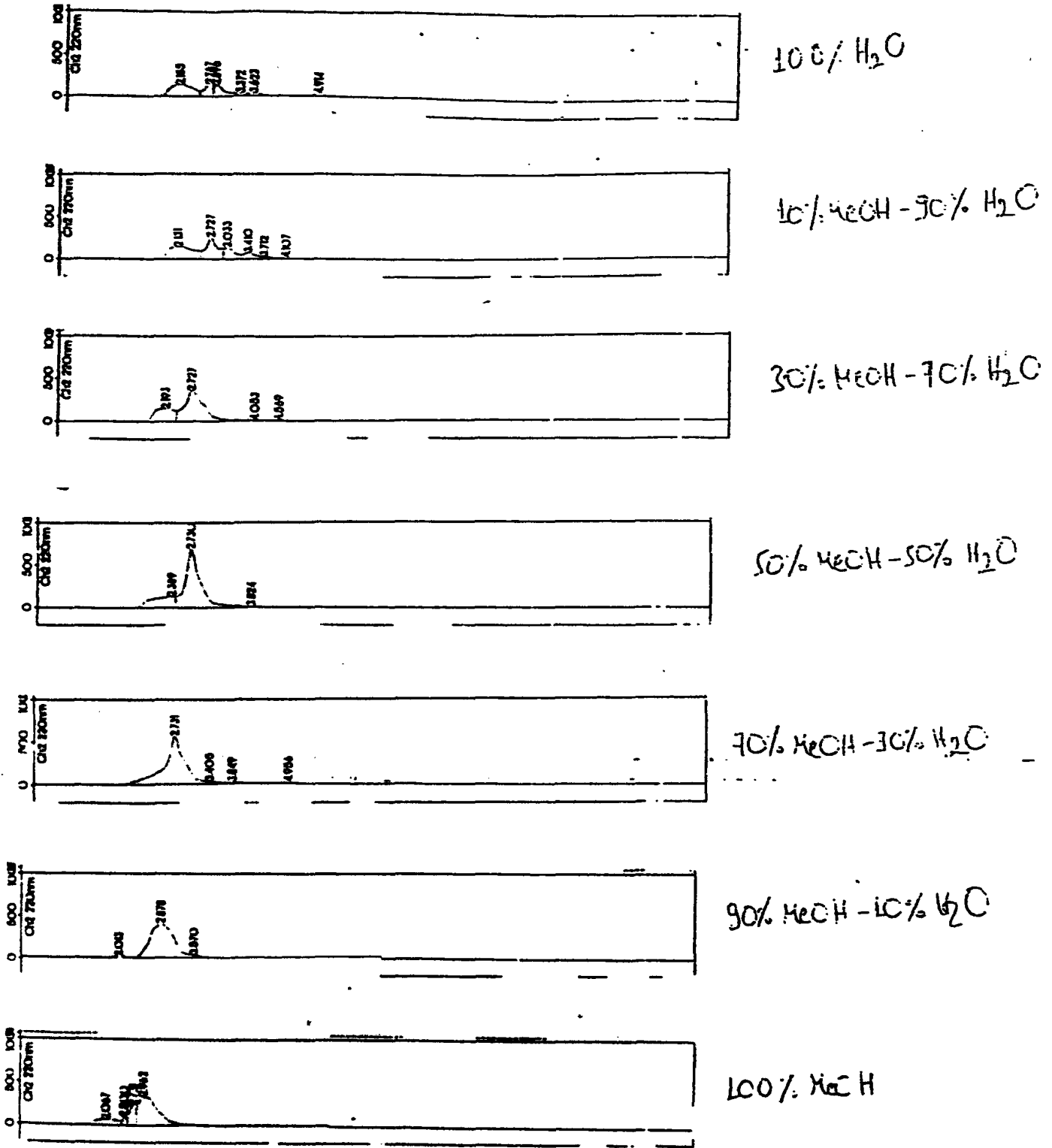
Με 90 % περιεκτικότητα σε ύδωρ ο συνολικός αριθμός κορυφών ανέρχεται σε έξι. Η πρώτη κορυφή στα 2,13 min παραμένει στην ομάδα ΠΒ1, η κορυφή στα 2,73 min από το προηγούμενο μίγμα χωρίζεται σε δύο: (α) την 2,73 min (ΠΑ1), και (β) την 2,91 min (ΠΑ2). Οι υπόλοιπες τρεις ανήκουν στην ομάδα ΠΒ2.

Με 100 % ύδωρ, παίρνουμε έξι κορυφές. Η κορυφή στα 2,73 min χωρίζεται σε δύο: (α) μία που εμφανίζεται σε χρόνο 2,77 min και που είναι η μεγαλύτερη, έχει πολύ υψηλή καθαρότητα (ομάδα ΠΑ2), και (β) μία που εμφανίζεται σε χρόνο 2,94 min (ομάδα ΠΑ2). Η πρώτη στα 2,19 min μοιάζει με την 2,21 min στο προηγούμενο μίγμα, έχει υψηλή καθαρότητα σε όλα τα μήκη κύματος και ανήκει στην ΠΒ1. Οι τρεις τελευταίες κορυφές που εμφανίζονται στα 3,37, 3,62 και 4,91 min έχουν πολύ υψηλή καθαρότητα πρέπει να είναι οι τελευταίες του προηγούμενου μίγματος και παραμένουν στην ΠΒ2.

Η συμφωνία των τιμών καθαρότητας των κορυφών αυτών στα χρωματογραφήματα με μέτρηση της καθαρότητας στα 220 και 280 nm δείχνει ότι η κορυφή στα 2,77 min, με 100 % υδατική κινητή φάση, οφείλεται σε ενώσεις που έχουν παρόμοια φάσματα. Από την άλλη πλευρά, οι καθαρότητες στα 220 nm είναι κάπως αυστηρότερο μέτρο για τη φασματική καθαρότητα των εκλυόμενων ενώσεων, επειδή περισσότερα είδη μορίων απορροφούν στην περιοχή αυτή μήκους κύματος.

Στο σχήμα 3.39 δίνεται η καθαρότητα της κορυφής στα 2,73 min στα διάφορα μίγματα μεθανόλης-ύδατος.





ΣΧΗΜΑ 3.38: Χρωματογραφήματα ισοκρατικής έκλουσης του αστικού λύματος με δυαδικά μίγματα μεθανόλης-ύδατος σε διαφορετικές αναλογίες



ΠΙΝΑΚΑΣ 16: Χρόνος κατακράτησης και καθαρότητα των χρωματογραφικών κορυφών που ελήφθησαν με απορρόφηση στα 220, 260 και 280 nm μετά από ισοκρατική έκλουση με σύστημα δυαδικού διαλύτη μεθανόλης-ύδατος σε διάφορες αναλογίες για το αστικό λύμα

% MeOH	t _R 220 nm	Καθαρότητα	t _R 260 nm	Καθαρότητα	t _R 280 nm	Καθαρότητα
100	2.07	0.9972				
	2.50	0.9992	2.52	0.0023		
	2.72	0.9905	2.77	0.9476	2.77	0.9595
	2.96	0.091	3.10	0.9785	3.10	0.9785
			3.22	0.9000	3.23	0.9000
90	2.01	0.9686				
	2.88	0.9415	2.83	0.2624	2.80	0.3343
			3.07	0.5359	3.09	0.4681
70	3.57	0.9910	3.57	0.1457	3.58	0.0791
	2.73	0.9651	2.73	0.0528	2.74	0.0429
			2.95	0.8425	2.96	0.8219
	3.40	0.9884	3.42	0.4221	3.42	0.3514
50	3.85	0.9722				
	4.96	0.9752				
	2.39	0.8844				
	2.73	0.0257	2.72	0.9894	2.72	0.9653
30			3.28	0.6337		
	3.82	0.8129	3.87	0.4376	3.83	0.9097
	2.19	0.9908	2.14	0.9953	2.15	0.9938
	2.73	0.0568	2.71	0.9076	2.71	-0.0262
			3.75	0.2613	3.70	0.9861
	4.05	0.9261			4.04	0.9326
10			4.34	0.9312	4.38	0.9918
	4.57	0.8578			4.64	0.8164
	2.13	0.9556	2.08	0.9503	2.05	0.9120
	2.73	0.9734	2.73	0.9601	2.73	0.9559
	3.03	0.9962	2.91	0.2407	2.91	0.7345
	3.41	0.9994	3.44	0.9992		
0	3.71	0.7289	3.76	0.7969	3.71	0.9128
	4.11	0.8355				
	2.19	0.9867	2.17	0.9794	2.21	0.9895
	2.77	0.9919				
	2.90	0.8516	2.89	0.6067	2.89	0.0551
	3.37	0.9922	3.36	0.9955		
		3.62	0.9990	3.70	0.9948	
		4.91	0.9977			



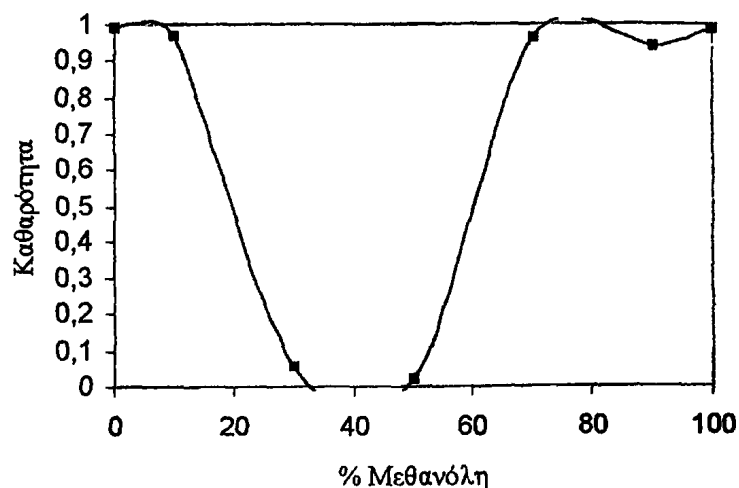
ΠΙΝΑΚΑΣ 17: Χρόνος κατακράτησης των φασματικών ομάδων στις οποίες κατηγοριοποιούνται - μετά από εφαρμογή της τεχνικής της ανάλυσης κατά συστάδες - οι χρωματογραφικές κορυφές που επετεύχθησαν με την αλλαγή της αναλογίας του εκλουστικού μεθανόλης-ύδατος

RT (min) water-MeOH mixture (%)	1.85	2.00	2.15	2.30	2.45	2.60	2.75	3.00	3.15	3.30	3.45	3.60	3.75	4.00	4.15	4.30	4.45	4.75	5.00	
100-0			ΠΒ1				ΠΑ2	ΠΑ2		ΠΒ2		ΠΒ2								ΠΒ2
90-10			ΠΒ1				ΠΑ1	ΠΑ2			ΠΒ2		ΠΒ2		ΠΒ2					
70-30			ΠΒ1				ΠΑ1						ΠΒ2	ΠΒ2				ΠΒ2		
50-50				ΠΒ1			ΙΑ1						ΠΒ2							
30-70							ΙΑ1	ΠΑ1				ΠΒ2		ΠΒ2						ΠΒ2
10-90		ΠΒ2					ΠΑ1	ΠΑ1		ΠΑ1		ΠΒ2								
0-100		ΠΒ2			ΠΒ1		ΠΒ1	ΠΒ1		ΠΒ1										

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της μεταβολής του χρόνου κατακράτησης καθώς και της καθαρότητας των χρωματογραφικών κορυφών με την μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης, μπορούμε να πούμε τα εξής:

Ο διαχωρισμός των ενώσεων που περιέχονται στα απόβλητα δείχνει την ύπαρξη μίας ή δύο κορυφών υψηλής απορρόφησης, που εκλούνται σε παράθυρο χρόνου 2,74 min έως 2,94 min και κάποιων μικρότερων κορυφών που εκλούνται λίγο νωρίτερα ή λίγο αργότερα. Με την αύξηση της μεθανόλης σε ποσοστό 50 %, η βασική κορυφή στα 2,74 min χάνει την καθαρότητά της καθώς αναμειγνύεται με γειτονικές κορυφές. Με περαιτέρω αύξηση της μεθανόλης, η κορυφή αυτή χωρίζεται σε άλλες τέσσερις παρόμοιας έντασης και φάσματος.





ΣΧΗΜΑ 3.39 : Καθαρότητα της κορυφής υψηλότερης απορρόφησης ισοκρατική έκλυση με κινητή φάση το δυαδικό σύστημα μεθανόλης-ύδατος υπό διαφορετικές αναλογίες

iv) Μίγματα ακετονιτριλίου-ύδατος

Το δείγμα αστικού λύματος εκλούσθηκε με διαφορετικές αναλογίες ακετονιτριλίου-ύδατος, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.40. Τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 18, όπου δίνεται ο χρόνος κατακράτησης και η καθαρότητα κάθε κορυφής στα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν με μέτρηση της απορρόφησης στα 220, 260 και στα 280 nm. Οι κορυφές στα 260 nm τις περισσότερες φορές εκλούνται στον ίδιο χρόνο με τις κορυφές στα 280 nm, πράγμα που δηλώνει ότι η απορρόφηση στα 260 και στα 280 nm οφείλεται στις ίδιες ενώσεις.

Στον Πίνακα 19 δίνεται η μετατόπιση του χρόνου κατακράτησης των διαφορετικών φασματικών υποομάδων κατά την έκλυση, όταν αυξάνεται η αναλογία του ακετονιτριλίου σε μίγμα με το ύδωρ. Αναλυτικά παρατηρούνται τα εξής:

Με βάση τους Πίνακες 18 και 19, όταν υπάρχει 100 % ακετονιτρίλιο στην κινητή φάση, εμφανίζονται τρεις κορυφές στα χρωματογραφήματα με ανίχνευση της



απορρόφησης στα 220 nm, ενώ με απορρόφηση στα 260 και 280 nm εμφανίζονται δύο κορυφές, η μία κορυφή μάλιστα βρίσκεται μακρύτερα από αυτές που φαίνονται στα 220 nm φάσματα. Η κορυφή υψηλότερης απορρόφησης που βγαίνει στα 2,97 min έχει υψηλή καθαρότητα, πολύ υψηλή απορρόφηση και ανήκει στην ομάδα IB2. Η αμέσως προηγούμενη στα 2,87 min ανήκει και αυτή στην ίδια ομάδα. Η πρώτη κορυφή ανήκει στην IB2 και η τελευταία στην IA2.

Με προσθήκη 10 % ύδατος, εμφανίζονται τρεις κορυφές. Οι δύο υψηλότερης απορρόφησης κορυφές, δηλαδή η μία στα 2,72 min που έχει τη μεγαλύτερη απορρόφηση, και σχετικά καλή καθαρότητα, και η άλλη στα 2,92 min με πολύ χαμηλή καθαρότητα ανήκουν στην ομάδα IB1. Η πρώτη κορυφή στα 1,82 min υπάρχει μόνο στα 220 nm, έχει πολύ υψηλή καθαρότητα και ανήκει στην IB2.

Με προσθήκη 30 % ύδατος, εμφανίζεται μόνο μία κορυφή στα 2,44 min, έχει υψηλή καθαρότητα και ανήκει στην ομάδα IA2. Μπορεί να υποτεθεί ότι οι μικρές κορυφές εξαφανίζονται, ενώ οι άλλες στα 2,72 min και στα 2,92 min του προηγούμενου μίγματος αναμιγνύονται και εκλούνται σε μικρότερο χρόνο παρασυρόμενες από το νερό.

Με 50 % ύδωρ στην κινητή φάση, εμφανίζεται μία μεγάλη κορυφή που εκλούεται σε ακόμη μικρότερο χρόνο, στα 2,38 min, και έχει υψηλή καθαρότητα. Μία μικρότερη εμφανίζεται στα 2,81 min με πολύ χαμηλή καθαρότητα και ένταση.

Αυξάνοντας σε 70 % την περιεκτικότητα σε ύδωρ, αυξάνεται ο αριθμός των κορυφών σε πέντε. Η πρώτη κορυφή στα 2,22 min εμφανίζεται μόνο στα 220 nm, έχει υψηλή καθαρότητα και ανήκει στην ομάδα IA2. Από τις άλλες δύο που έχουν σχετικά καλή καθαρότητα η μία στα 2,47 min έχει πολύ υψηλή απορρόφηση και ανήκει στην IA2 και η άλλη στα 3,18 min με χαμηλή απορρόφηση ανήκει στην IB2. Δύο μικρές κορυφές που βγαίνουν στα 3,44 και στα 3,83 min δεν λαμβάνονται υπόψη.

Αυξάνοντας περισσότερο το ύδωρ σε 90 %, αυξάνεται ακόμη περισσότερο ο αριθμός των κορυφών. Η πρώτη στα 2,21 min με υψηλή καθαρότητα, ανήκει στην IB1 και εμφανίζεται σε όλα τα μήκη κύματος. Η δεύτερη κορυφή στα 2,76 min που είναι και η μεγαλύτερη από όλες, έχει χαμηλή απορρόφηση στα 220 και 260 nm και υψηλή στα 280 nm και ανήκει στην IB1. Η αμέσως επόμενη στα 3,10 min έχει υψηλή καθαρότητα, φαίνεται μόνο στα 280 nm και ανήκει στην IB2. Οι τρεις τελευταίες στα



3,46, 3,74 και 4,03 min έχουν σχετικά καλές καθαρότητες και ανήκουν στην ομάδα ΠΒ2.

Η αποκλειστικά υδατική κινητή φάση, δίνει έξι κορυφές. Η πρώτη στα 2,19 min μοιάζει με την κορυφή στα 2,21 min στο προηγούμενο μίγμα, έχει υψηλή καθαρότητα σε όλα τα μήκη κύματος και ανήκει στην ΠΒ1. Η δεύτερη κορυφή στα 2,77 min, που είναι και η μεγαλύτερη, έχει πολύ υψηλή καθαρότητα και ανήκει στην ΠΑ2. Η τρίτη κορυφή στα 2,90 min, πρέπει να είναι η κορυφή στα 3,10 min του προηγούμενου μίγματος, ανήκει και αυτή στην ΠΑ2. Οι τρεις τελευταίες κορυφές που βγαίνουν στα 3,37, 3,62 και 4,93 min έχουν πολύ υψηλή καθαρότητα πρέπει να είναι οι τελευταίες του προηγούμενου μίγματος και παραμένουν στην ΠΒ2.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι με αύξηση του ποσοστού του ακετονιτριλίου στην κινητή φάση παρατηρούνται οι ακόλουθες μεταβολές στα χρωματογραφήματα στην καθαρότητα των κορυφών και στην φασματική τους κατηγορία:

- Μεταβάλλεται ο αριθμός των κορυφών στο χρωματογράφημα
- Μεταβάλλεται ο χρόνος κατακράτησης (t_R) των κορυφών στο χρωματογράφημα
- Μεταβάλλεται η φασματική καθαρότητα των χρωματογραφικών κορυφών
- Μεταβάλλεται η ένταση απορρόφησης των χρωματογραφικών κορυφών
- Μεταβάλλεται το φάσμα τους και η φασματική τους κατηγορία
- Η μεταβολή του φάσματος με την ακόλουθη μεταβολή της φασματικής κατηγορίας του, συνοδεύεται από μεταβολή της καθαρότητας της χρωματογραφικής κορυφής.

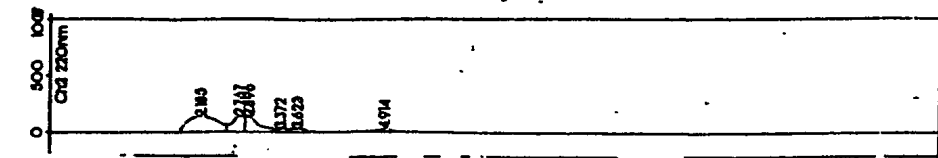
Από τα φάσματα των χρωματογραφικών κορυφών που ελήφθησαν στην πορεία των εργασιών διαπιστώθηκε ότι:

Μερικές κορυφές έχουν φάσμα που περιορίζεται στην φασματική περιοχή 200-235 nm

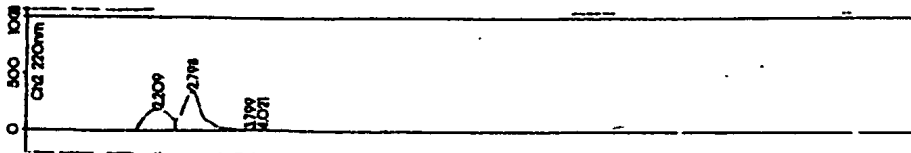
Κάποιες κορυφές δίνουν φάσμα που εκτείνεται στην φασματική περιοχή 250-300 nm

Οι πλείστες κορυφές δίνουν φάσμα που είναι συνεχές και εκτείνεται από 200-300 nm

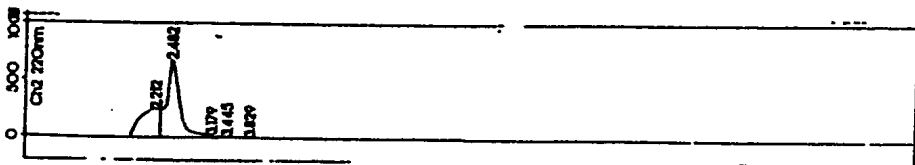




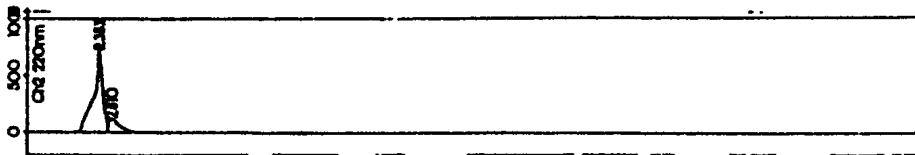
100% H₂O



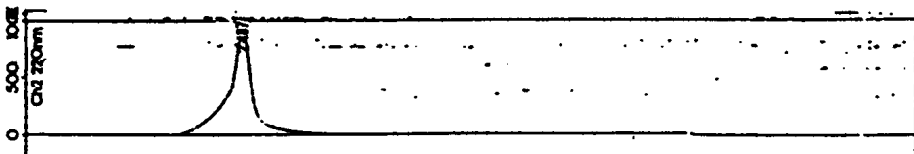
10% MeCN-90% H₂O



30% MeCN-70% H₂O



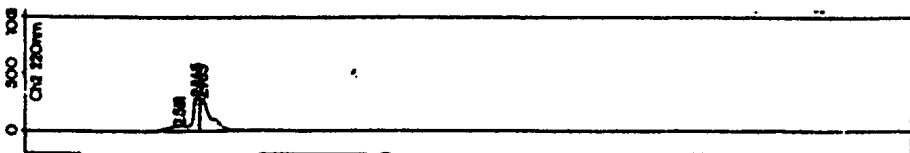
50% MeCN-50% H₂O



70% MeCN-30% H₂O



90% MeCN-10% H₂O



100% MeCN

ΣΧΗΜΑ 3.40: Χρωματογραφήματα ισοκρατικής έκλυσης του αστικού λύματος με δυαδικά μίγματα ακετονιτριλίου-ύδατος σε διαφορετικές αναλογίες



ΠΙΝΑΚΑΣ 18: Χρόνος κατακράτησης και καθαρότητα των χρωματογραφικών κορυφών που ελήφθησαν με απορρόφηση στα 220, 260 και 280 nm μετά από ισοκρατική έκλυση με σύστημα δυαδικού διαλύτη ακετονιτριλίου-ύδατος σε διάφορες αναλογίες για το αστικό λύμα

% MeCN	t _R 220 nm	Καθαρότητα	t _R 260 nm	Καθαρότητα	t _R 280 nm	Καθαρότητα
100	2.58	0.0071				
	2.87	0.0324				
	2.97	0.9886	3.01	0.9977	3.02	0.9974
			3.20	0.9586	3.19	0.9509
90	1.82	0.9999				
	2.72	0.8441	2.72	0.8387	2.72	0.7040
	2.92	0.3889	2.92	0.0298	2.92	0.0323
70	2.44	0.9406	2.43	0.9355	2.43	0.9391
50	2.38	0.9930	2.38	0.9800	2.38	0.9805
	2.81	0.0311				
30	2.21	0.9844				
	2.48	0.8050	2.48	0.9901	2.48	0.9933
	3.18	0.7342			3.14	0.8225
	3.44	0.9815	3.42	0.9454	3.46	0.9635
	3.83	0.9783				
10	2.21	0.9403	2.21	0.9965	2.23	0.9972
	2.80	0.0017	2.76	0.2925	2.76	0.9783
					3.10	0.9963
			3.47	0.9846	3.46	0.8314
	3.80	0.3026			3.72	0.8347
	4.02	0.8944	4.01	0.7975	4.03	0.8343
0	2.19	0.9867	2.17	0.9794	2.21	0.9895
	2.77	0.9919				
	2.90	0.8516	2.89	0.6067	2.89	0.0551
	3.37	0.9922	3.36	0.9955		
	3.62	0.9990	3.70	0.9948		
	4.91	0.9977				



ΠΙΝΑΚΑΣ 19: Χρόνος κατακράτησης των φασματικών ομάδων στις οποίες κατηγοριοποιούνται - μετά από εφαρμογή της τεχνικής της ανάλυσης κατά συστάδες - οι χρωματογραφικές κορυφές που επετεύχθησαν με την αλλαγή της αναλογίας του εκλουστικού ακετονιτριλίου-ύδατος

RT (min)	1.85	2.00	2.15	2.30	2.45	2.60	2.75	3.00	3.15	3.30	3.45	3.60	3.75	4.00	4.15	4.30	4.45	4.75	5.00	
Water-MeCN mixture (%)																				
100-0			ΠΒ1				ΠΑ2	ΠΑ2		ΠΒ2		ΠΒ2								ΠΒ2
90-10			ΠΒ1				ΙΒ1	ΠΒ2			ΠΒ2		ΠΒ2	ΠΒ2						
70-30			ΠΑ2		ΙΑ2				ΠΒ2		?		?							
50-50					?		?													
30-70					ΙΑ2															
10-90	ΠΒ2						ΙΒ1	ΙΒ1												
0-100						ΠΒ2	ΙΒ2	ΙΒ2	ΠΑ2											

ν) Μίγματα ακετονιτριλίου-μεθανόλης

Τα χρωματογραφήματα έκλουσης δίνονται στο σχήμα 3.41. Στον Πίνακα 20 δίνονται ο χρόνος κατακράτησης και η καθαρότητα κάθε κορυφής στα χρωματογραφήματα με ανίχνευση της απορρόφησης στα 220, 260 και στα 280 nm για όλα τα μίγματα ακετονιτριλίου-μεθανόλης.

Από τον πίνακα 21 παρατηρείται ότι η πλειοψηφία των κορυφών ανήκει στις ομάδες ΠΒ1, ενώ υπάρχουν και κάποιες που γίνονται ΠΒ2 στο 100% ακετονιτρίλιο. Δείχνουν δηλαδή οι κορυφές να δίνουν την αυτή κατηγορία φασμάτων, όταν το εκλουστικό



μέσο είναι ακετονιτρίλιο-μεθανόλη σε διαφορετικές αναλογίες. Το ακετονιτρίλιο αλλάζει πάντως το φάσμα των έντονων κορυφών αυξάνοντας την απορρόφησή τους, ενώ παράλληλα φαίνεται να εξαφανίζει τις μικρές κορυφές, που είναι και οι λιγότερο πολικές. Οι έντονες κορυφές από IB2 με 100% ακετονιτρίλιο γίνονται IIB1 με 100% μεθανόλη. Αναλυτικά παρατηρούνται τα εξής:

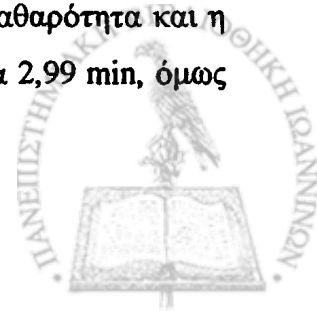
Με 100 % ακετονιτρίλιο στην κινητή φάση, εμφανίζονται τρεις κορυφές στα χρωματογραφήματα απορρόφησης στα 220 nm, ενώ με απορρόφηση στα 260 και 280 nm εμφανίζονται δύο κορυφές, η μία κορυφή μάλιστα παρουσιάζει μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης από αυτές που απορροφούν στα 220 nm. Η μεγαλύτερη κορυφή που εμφανίζεται στα 2,97 min έχει υψηλή καθαρότητα, πολύ υψηλή απορρόφηση και ανήκει στην ομάδα IB2. Η αμέσως προηγούμενη στα 2,87 min ανήκει και αυτή στην ίδια ομάδα Η πρώτη ανήκει στην IIB2 και η τελευταία στην IIA2.

Προσθέτοντας 10 % μεθανόλη στην κινητή φάση, παίρνουμε πιο νωρίς την πρώτη κορυφή (2,20 min) μόνο στα 220 nm, με υψηλή καθαρότητα ενώ παραμένει στην IIB2. Η μεγαλύτερη κορυφή που εμφανίζεται στα 2,84 min, ανήκει στην IIA1, ενώ από τις άλλες δύο κορυφές, η μία στα 3,03 min με υψηλή καθαρότητα εμφανίζεται στα 260 και 280 nm και η άλλη στα 3,24 min μόνο στα 220 nm. Η τελευταία έχει πολύ χαμηλή καθαρότητα. Και οι δύο τελευταίες ανήκουν στην IIB1.

Με αύξηση της μεθανόλης σε 30 %, αυξάνεται ο αριθμός των κορυφών σε έξι. Η πρώτη κορυφή μετατοπίζεται σε ακόμη μικρότερο χρόνο κατακράτησης στα 1,90 min εξακολουθώντας να έχει υψηλή καθαρότητα και ανήκει και αυτή στην IIB2. Οι τρεις επόμενες έχουν υψηλή καθαρότητα, ενώ οι δύο τελευταίες χαμηλή. Μεγαλύτερη απορρόφηση έχουν οι κορυφές στα 2,96 και 2,62 min. Οι πέντε αυτές κορυφές ανήκουν στην ομάδα IIB1.

Με ίση αναλογία ακετονιτρίλιου-μεθανόλης, ο αριθμός των κορυφών μειώνεται σε πέντε. Η πρώτη στα 1,90 min παραμένει η ίδια και ανήκει στην ομάδα IIB2. Οι επόμενες κορυφές ανήκουν στην IIB1.

Με 70 % μεθανόλη στην κινητή φάση, ο αριθμός των κορυφών αυξάνεται. Η πρώτη κορυφή εμφανίζεται σε μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης στα 2,00 min και ανήκει στην IIB2. Η δεύτερη που εμφανίζεται στα 2,52 min, έχει υψηλή καθαρότητα και η τρίτη στα 2,70 min ανήκουν επίσης στην ομάδα IIB1. Η κορυφή στα 2,99 min, όμως

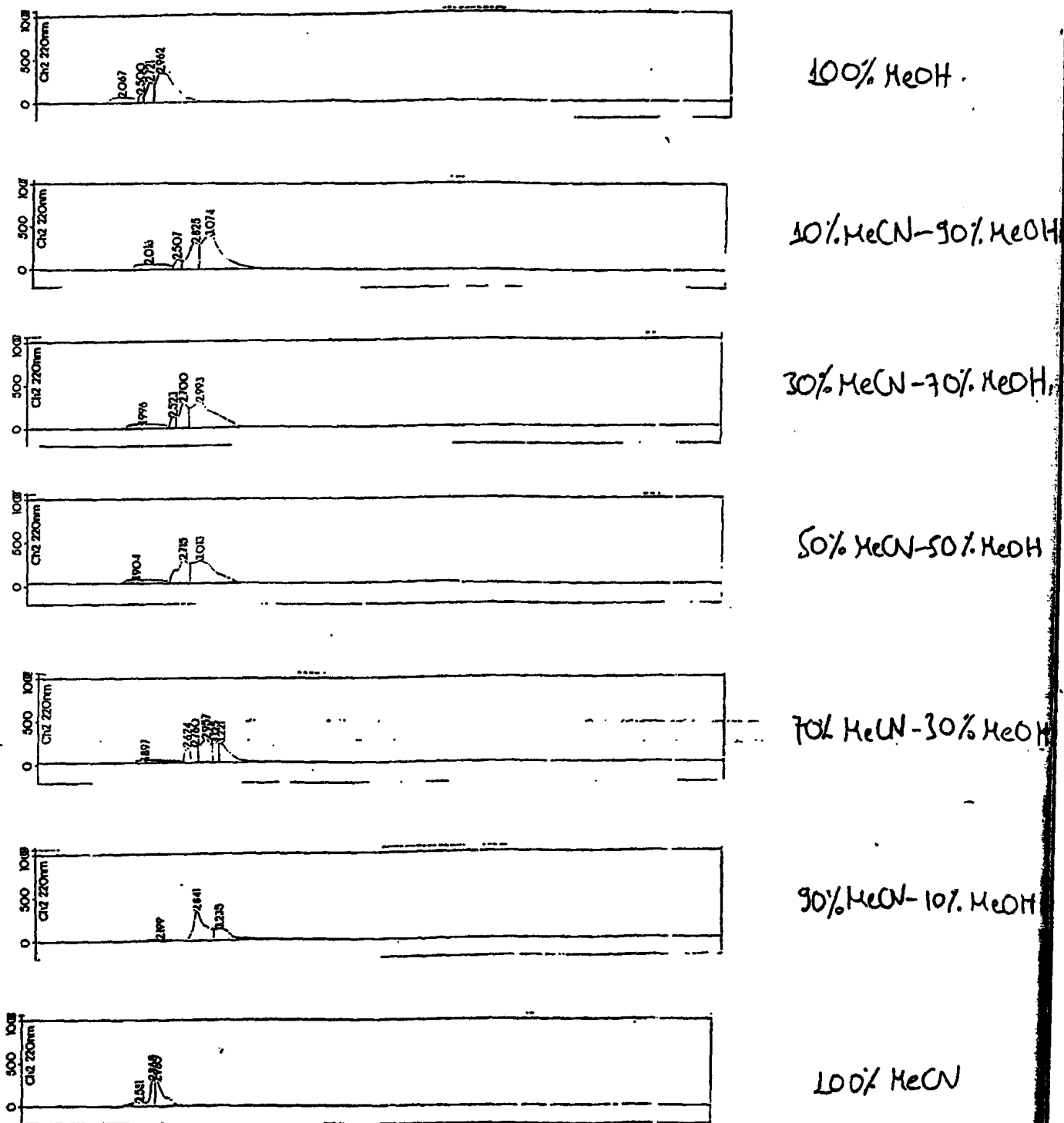


έχει χαμηλή καθαρότητα, αλλά ανήκει και αυτή στη ΠΒ1. Οι περισσότερες έχουν υψηλή καθαρότητα. Μόνο η τελευταία ανήκει στη ΠΒ2.

Με μεγαλύτερο ακόμη ποσοστό μεθανόλης 90 %, εμφανίζονται πέντε κορυφές. Η πρώτη παραμένει στα 2,02 min με υψηλή καθαρότητα και ανήκει στη ΠΒ2. Οι επόμενες τρεις ανήκουν στην ΠΒ1. Η κορυφή στα 2,52 min του προηγούμενου μίγματος παραμένει και αυτή στον ίδιο χρόνο κατακράτησης. Οι επόμενες όμως μετατοπίζονται και αναμιγνύονται δίνοντας στα 2,82 και 3,07 min έχουν χαμηλές καθαρότητες στα 220 nm. Η κορυφή στα 3,14 min παραμένει, ενώ η 3,52 min του προηγούμενου μίγματος μετατοπίζεται λίγο αργότερα στα 3,72 min με χαμηλή καθαρότητα και ανήκει στην ΠΒ2.

Με 100 % μεθανόλη, προκύπτουν συνολικά πέντε κορυφές. Οι τέσσερις ανήκουν στη ΠΒ1, ενώ η πρώτη που εμφανίζεται πιο νωρίς στα 2,05 min ανήκει στη ΠΒ2. Οι τρεις μεγαλύτερες ανιχνεύσιμες κορυφές σχηματίζονται σε μία φαρδιά ταινία απορρόφησης που απλώνεται από 2,50 μέχρι τα 3,25 min. Όλες οι κορυφές είναι φαρδιές και απορροφούν σχετικά έντονα στα 220 nm και πολύ λιγότερο στα 280 nm.





ΣΧΗΜΑ 3.41: Χρωματογραφήματα ισοκρατικής έκλυσης του αστικού αποβλήτου με δυαδικά μίγματα ακετονιτριλίου-μεθανόλης σε διαφορετικές αναλογίες



ΠΙΝΑΚΑΣ 20: Χρόνος κατακράτησης και καθαρότητα των χρωματογραφικών κορυφών που ελήφθησαν με απορρόφηση στα 220, 260 και 280 nm μετά από ισοκρατική έκλυση με σύστημα δυαδικού διαλύτη ακετονιτριλίου-μεθανόλης σε διάφορες αναλογίες για το αστικό λύμα

% MeCN	t _R 220 nm	Καθαρότητα	t _R 260 nm	Καθαρότητα	t _R 280 nm	Καθαρότητα
100	2.58	0.0071				
	2.87	0.0324				
	2.97	0.9886	3.01	0.9977	3.02	0.9974
			3.20	0.9586	3.19	0.9509
90	2.20	0.9876				
	2.84	0.9284	3.01	0.9546	3.03	0.9559
	3.24	0.1395				
70	1.90	0.9619				
	2.62	0.9979				
	2.76	0.9843				
	2.96	0.9688	2.96	0.9403		
	3.13	0.6578	3.10	0.1330	3.10	0.9796
	3.22	0.1303				
50	1.90	0.9971				
	2.71	0.9979				
	3.01	0.0632	3.11	0.9911	3.12	0.9839
					3.52	0.8085
30	2.00	0.9994				
	2.52	0.9984				
	2.70	0.9933			2.83	0.8138
	2.99	0.2834				
			3.12	0.9887	3.14	0.8467
			3.52	0.6871	3.52	0.7102
10	2.02	0.9967				
	2.51	0.9935	2.52	0.7946		
	2.82	0.7609				
	3.07	0.0455	3.14	0.9149	3.14	0.9834
					3.72	0.1887
0	2.07	0.9972				
	2.50	0.9992	2.52	0.0023		
	2.72	0.9905	2.77	0.9476	2.77	0.9595
	2.96	0.091	3.10	0.9785	3.10	0.9785
			3.22	0.8872	3.23	0.9000



ΠΙΝΑΚΑΣ 21: Χρόνος κατακράτησης των φασματικών ομάδων στις οποίες κατηγοριοποιούνται - μετά από εφαρμογή της τεχνικής της ανάλυσης κατά συστάδες - οι χρωματογραφικές κορυφές που επετεύχθησαν με την αλλαγή της αναλογίας του εκλουστικού ακετονιτριλίου-μεθανόλης

RT (min) MeCN-MeOH mixture (%)	1.90	2.00	2.10	2.20	2.30	2.40	2.50	2.60	2.70	2.80	2.90	3.00	3.10	3.20	3.30	3.40	3.50	3.60	3.70	
100-0								ΠΒ2			ΙΒ2	ΙΒ2		ΠΑ2						
90-10				ΠΒ2						ΠΑ1		ΙΒ1		ΙΒ1						
70-30	ΙΒ2							ΙΒ1		ΠΒ1		ΙΒ1	ΙΒ1	ΙΒ1						
50-50	ΙΒ2								ΙΒ1			ΙΒ1	ΙΒ1					ΙΒ1		
30-70		ΙΒ2					ΙΒ1		ΙΒ1	ΠΒ1		ΙΒ1						ΙΒ2		
10-90		ΙΒ2					ΙΒ1			ΠΒ1			ΙΒ1							ΙΒ2
0-100		ΙΒ2					ΙΒ1		ΙΒ1			ΙΒ1		ΙΒ1						

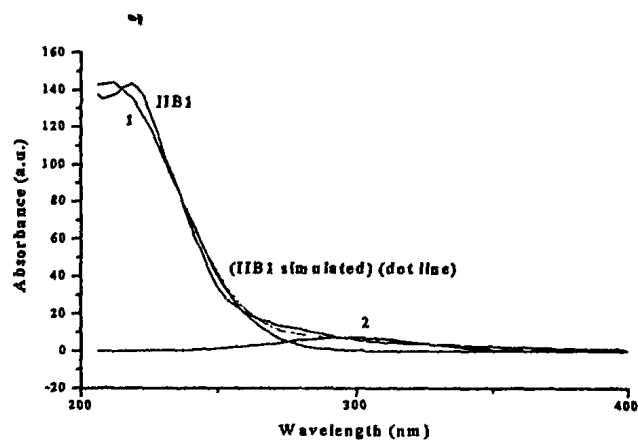
Συμπερασματικά, μπορεί να λεχθεί ότι ο αριθμός των κορυφών είναι αρκετά αυξημένος, ενώ τα φάσματά τους είναι παρόμοια. Οι δύο διαλύτες έχουν παρόμοια εκλουστική ισχύ, διαφέρουν στις ιδιότητες δότη/δέκτη πρωτονίων. Πάντως, κρίνοντας από τα φάσματα των ενώσεων βλέπουμε ότι υπερτερεί το σχήμα με το 100 % μεθανόλη. Δηλαδή, το ακετονιτρίλιο δεν επηρεάζει τον αριθμό των κορυφών ούτε το φάσμα τους, παρά μόνο όταν είναι σε αναλογία 90 %-100 %. Με τη μεθανόλη, οι χρόνοι κατακράτησης των πολικών ιδίως ενώσεων είναι πολύ πιο χαμηλοί από ότι με το ακετονιτρίλιο. Επίσης, χωρίζει τις δύο πιο μεγάλες κορυφές (2,87 και 2,97 min) που βγαίνουν με το ακετονιτρίλιο σε τρεις, στα 2,50, 2,72, 2,96 min. Τα αποτελέσματα των χρωματογραφημάτων οδηγούν στο συμπέρασμα, ότι η μεθανόλη μπορεί να ξεχωρίσει το κύριο σύμπλεγμα κορυφών, ενώ το ακετονιτρίλιο δίνει πολύ υψηλής έντασης κορυφές και εμποδίζει την έκλυση των μικρότερων καλύπτοντάς τες.



3.4.2 Επιλογή των γνήσιων κορυφών με βάση δύο μεθόδους

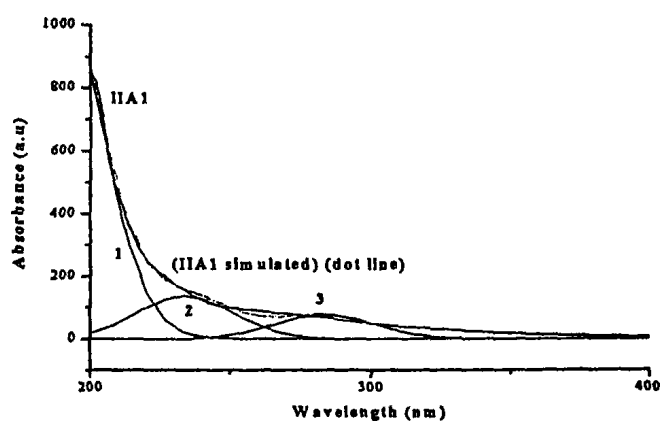
Σε μία ποιοτική προσέγγιση που έγινε, τα φάσματα των κορυφών υψηλής καθαρότητας που εκλούσθηκαν με 100 % ύδωρ, επεξεργάστηκαν με την Gaussian μέθοδο ανάλυσης συμπλέγματος κορυφών σε επιμέρους μοναδικές κορυφές και χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα για τη σύγκριση με τα αντίστοιχα φάσματα των μη καθαρών κορυφών. Ένα παράδειγμα είναι το φάσμα της κορυφής της ομάδας IA1 με 70%-30% (μεθανόλη-ύδωρ). Σύμφωνα με τη μέθοδο που ακολουθήθηκε τα φάσματα των κορυφών που ανήκουν στις ομάδες IB1, ΠΑ1 και ΠΑ2 και έχουν σχεδόν 99 % φασματική καθαρότητα προτείνονται ως τα πιο πιθανά για να συνεισφέρουν στο φάσμα της κορυφής που ανήκει στην ομάδα IA1 που έχει χαμηλή καθαρότητα. Στο σχήμα 3.42 δίνονται τα φάσματα των τριών καθαρών κορυφών των ομάδων IB1, ΠΑ1 και ΠΑ2 αντίστοιχα, ενώ στο σχήμα 3.43 το φάσμα της κορυφής από την ομάδα IA1 καθώς και το προσομοιωμένο με αυτό. Οι παράμετροι προσομοίωσης, ένταση, μήκος κύματος στα μέγιστα και εύρος της καμπύλης δίνονται στους πίνακες κάτω από τα αντίστοιχα σχήματα. Έτσι, το φάσμα της ομάδας IA1 δείχνει μέγιστα στα μήκη κύματος που ταιριάζουν με τα μέγιστα στις κορυφές από τις ομάδες IB1, ΠΑ2 και ΠΑ1.





$$R^2=0.98372$$

1		2	
A_{\max}	149.388098	A_{\max}	5.63836945
λ_{\max}	206.403011	λ_{\max}	270.134899
Width	25.2126464	Width	25.2126464

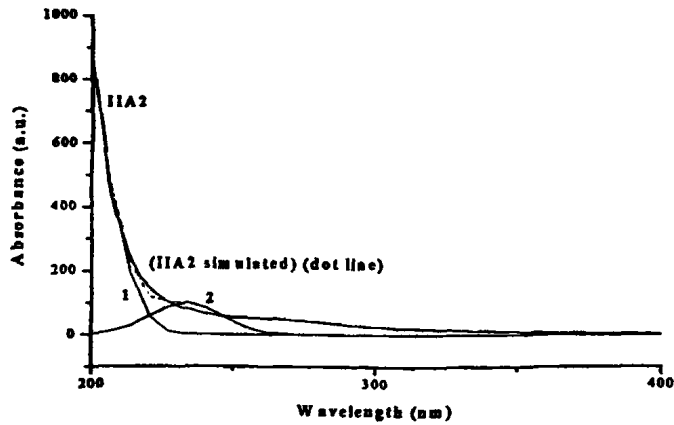


$$R^2=0.958336$$

1		2		3	
A_{\max}	598.988508	A_{\max}	61.9305026	A_{\max}	17.8375720
λ_{\max}	197.989252	λ_{\max}	255.749842	λ_{\max}	295.471531
Width	17.0242035	Width	17.0242035	Width	17.0242035

ΣΧΗΜΑ 3.42: Gaussian μέθοδος ανάλυσης των φασματικά καθαρών ομάδων ΠB1, ΠA1 και ΠA2

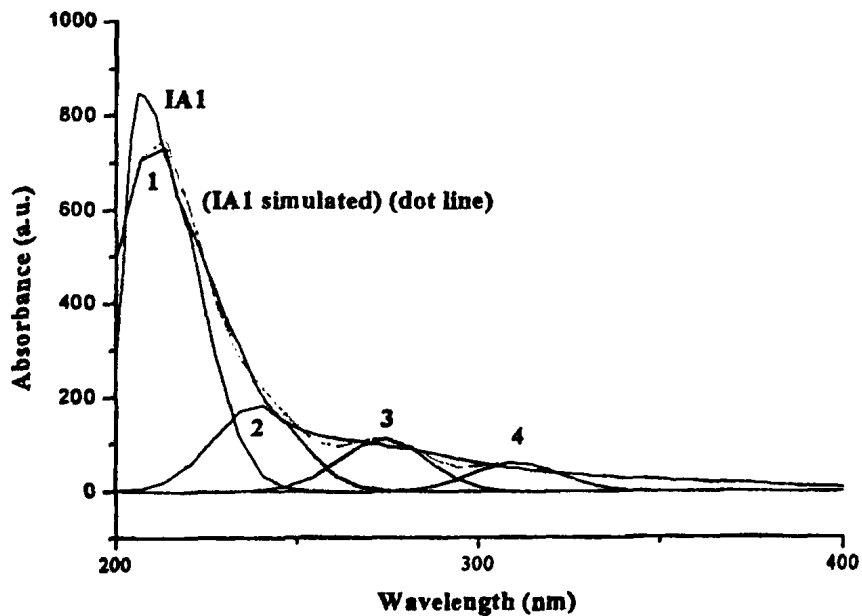




$$R^2=0.869355$$

1		2	
A_{max}	449.412995	A_{max}	30.9417594
λ_{max}	201.606516	λ_{max}	263.132348
Width	12.6396927	Width	12.6396927

ΣΧΗΜΑ 3.42 (συνέχεια)



$$R^2=0.975534$$

1		2		3		4	
A_{max}	720.743176	A_{max}	139.643706	A_{max}	73.8963112	A_{max}	29.2299053
λ_{max}	211.530814	λ_{max}	240.987983	λ_{max}	275.533170	λ_{max}	308.343445
Width	11.9299018	Width	11.9299018	Width	11.9299018	Width	11.9299018

ΣΧΗΜΑ 3.43: Gaussian μέθοδος ανάλυσης της σχετικά μη-καθαρής φασματικά κορυφής που εκλύεται με 50% MeOH - 50% H₂O και ανήκει στην ομάδα IA1



Το φάσμα της κορυφής που ανήκει στην ομάδα ΙΑ1 με εκλουστικό 50%-50% (μεθανόλη-ύδωρ) είναι χαρακτηριστικό για τη χαμηλή καθαρότητα. Είναι η μόνη κορυφή που εκλούεται μεταξύ 2 και 5 λεπτών στο χρωματογράφημα, ενώ οι κορυφές των ομάδων ΙΙΑ1, ΙΙΑ2 και ΙΙΒ1 εκλούνται σε άλλες αναλογίες της κινητής φάσης σε κοντινούς χρόνους κατακράτησης. Προτείνεται συνεπώς, ότι η ειδική κορυφή στην ομάδα ΙΑ1 προέρχεται με ταυτόχρονη έκλυση των γειτονικών κορυφών κάτω από άλλες συστάσεις κινητής φάσης, στις οποίες συστάσεις τα φάσματα των ομάδων ΙΙΑ1, ΙΙΑ2 και ΙΙΒ1 συγκλίνουν και έτσι η φασματική καθαρότητα της κορυφής ΙΑ1 γίνεται πολύ μικρή.

Για να ερευνηθεί η εγκυρότητα του συμπεράσματος αυτού καταγράφονται τα δεδομένα απορρόφησης από τα 205 μέχρι και τα 350 nm για τις κορυφές υψηλής καθαρότητας για τις ομάδες ΙΙΒ1 και ΙΙΑ2 (κορυφές με 100 % ύδωρ) και την ομάδα ΙΙΑ1 (κορυφή με 10%-90% μεθανόλη-ύδωρ).

Έτσι, για τις καθαρές ενώσεις ισχύει ο νόμος του Beer: $A_{\lambda_i} = \varepsilon_{\lambda_i} bc$

Όπου b =σταθερό και c =σταθερό, οπότε: $\log A_{\lambda_i} = \log \varepsilon_{\lambda_i} + \log b + \log c = \log \varepsilon_{\lambda_i} + \log c$

Παραγωγίζοντας ως προς το μήκος κύματος προκύπτει: $\frac{d(\log A_{\lambda_i})}{d\lambda_i} = \frac{d(\log \varepsilon_{\lambda_i})}{d\lambda_i}$

Μετατρέπηκαν έτσι τα φάσματα των κορυφών σε διαγράμματα του $\frac{d(\log A_{\lambda_i})}{d\lambda_i}$ έναντι του

μήκους κύματος, τα οποία είναι ουσιαστικά τα διαγράμματα $\frac{d(\log \varepsilon_{\lambda_i})}{d\lambda_i}$ έναντι του μήκους

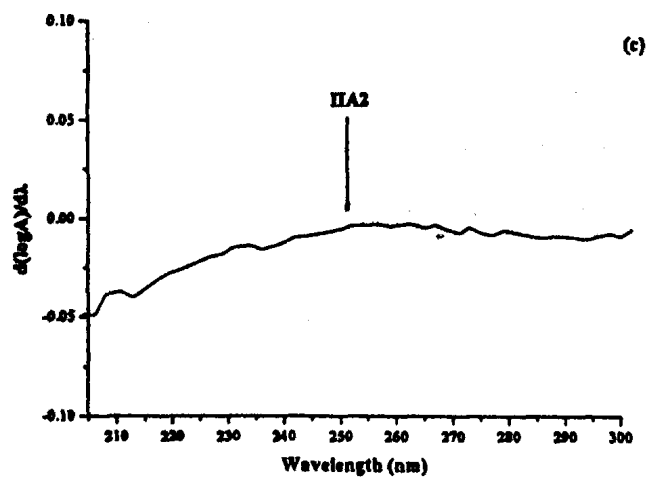
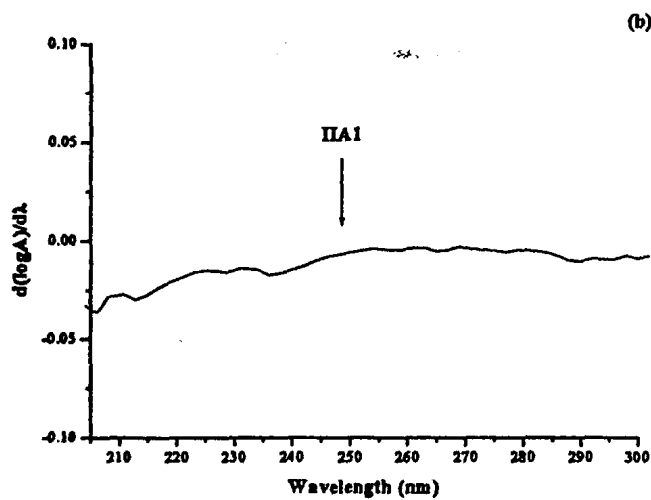
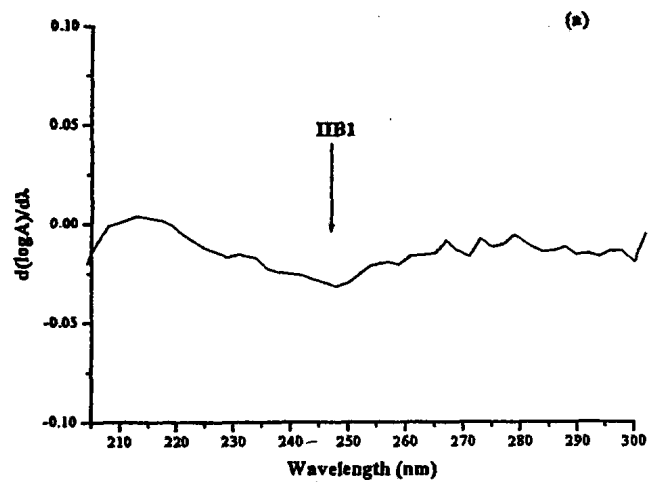
κύματος που είναι ανεξάρτητα της συγκέντρωσης της ένωσης που απορροφά.

Στο σχήμα 3.44 που ακολουθεί δίνονται τα διαγράμματα των $\frac{d(\log A_{\lambda_i})}{d\lambda_i}$ έναντι του μήκους

κύματος για τις υψηλής φασματικής καθαρότητας κορυφές των ομάδων ΙΙΒ1, ΙΙΑ1 και ΙΙΑ2 και τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατόπιν ως πρότυπα για την εξομοίωση με την χαμηλής

καθαρότητας κορυφή από την ομάδα ΙΑ1 που εκλούσθηκε με 50%-50% (μεθανόλη-ύδωρ).





ΣΧΗΜΑ 3.44: Διαγράμματα $\frac{d(\log A_{\lambda_i})}{d\lambda_i}$ έναντι του μήκους κύματος για τις υψηλά καθαρές κορυφές των

ομάδων ΠB1, ΠA1 και ΠA2



Στο σχήμα 3.45 δίνεται το διάγραμμα $\frac{d(\log A_{\lambda_i})}{d\lambda_i}$ έναντι του μήκους κύματος για το ΙΑ1 και το αντίστοιχο που παράγεται από την πρόσθεση των δεδομένων απορρόφησης των συμβατικών φασμάτων, υπολογίζοντας το $\log A_{\lambda_i}$, έπειτα το $\frac{d(\log A_{\lambda_i})}{d\lambda_i}$ και κάνοντας το γράφημα καταγράφονται το $\frac{d(\log A_{\lambda_i})}{d\lambda_i}$ έναντι του μήκους κύματος.

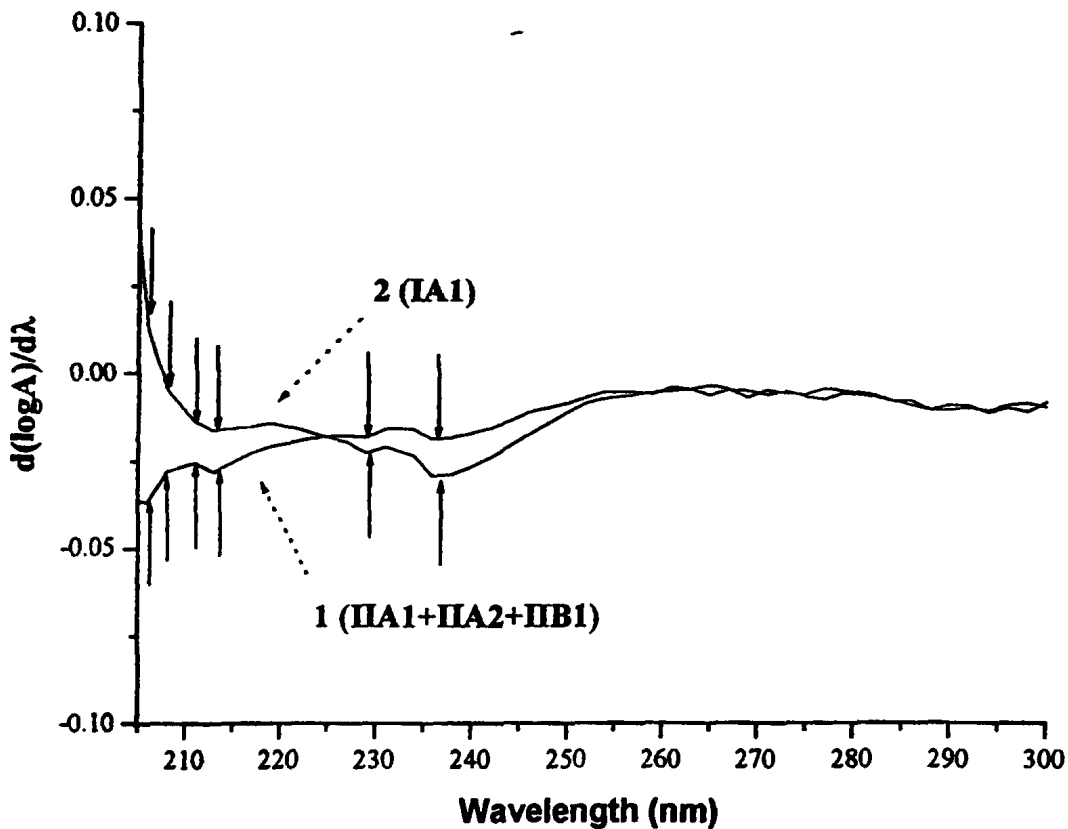
Παρατηρείται από τα διαγράμματα του σχήματος 3.45, ότι υπάρχει λογική συμφωνία και οι αποκλίσεις στο μπροστινό μέρος των διαγραμμάτων οφείλονται πιθανόν στην χαμηλή επαναληψιμότητα του ανιχνευτή στα χαμηλά μήκη κύματος. Ένας άλλος παράγοντας μπορεί να είναι το γεγονός ότι η φασματική καθαρότητα δεν είναι 100 %. Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω άλλων ενώσεων που συνεισφέρουν μέχρι τα 210 nm μόνο. Αυτό είναι φαύδωρ επίσης από το διάγραμμα $\frac{d(\log A_{\lambda_i})}{d\lambda_i}$ έναντι του μήκους κύματος, όπου αν και τα

χαρακτηριστικά (οι αλλαγές στην κλίση) είναι όμοια για τις δύο καμπύλες, η διαφορά μεταξύ τους είναι υψηλότερη στην φασματική περιοχή μεταξύ 205-210 nm. Τα διαγράμματα αυτά μπορεί επίσης να επεξεργαστούν και με ανάλυση πολλαπλής συμμεταβολής.

Οι μεταβολές του αριθμού των κορυφών και/ή της φασματικής καθαρότητας στα χρωματογραφήματα του δείγματος με ισοκρατική έκλυση και κινητή φάση μεταβαλλόμενης αναλογίας δυαδικού διαλύτη είναι αποτέλεσμα της διαφοροποίησης των αλληλεπιδράσεων των συστατικών του λύματος με τα μόρια του συστήματος διαλυτών της κινητής φάσης κατά την μεταβολή της αναλογίας των. Από την άλλη πλευρά, οι αλλαγές στα φασματικά χαρακτηριστικά πρέπει να οφείλονται στην διαφοροποίηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων συστατικών και των μορίων των διαλυτών που συνιστούν την κινητή φάση, λόγω της μεταβαλλόμενης σύστασης της τελευταίας. Τέτοιες αλλαγές έχουν ληφθεί υπόψη στην ανάλυση σε συστάδες. Η αλλαγή στα φασματικά χαρακτηριστικά που συνοδεύεται με χαμηλή φασματική καθαρότητα είναι παράγοντας που μπορεί να ξεχωρίσει τις καθαρές από τις μη καθαρές κορυφές. Οι αλλαγές στο χρόνο κατακράτησης των ενώσεων με την αλλαγή στην αναλογία των διαλυτών στην κινητή φάση είναι γνωστό ότι οφείλονται στις αλλαγές των



αλληλεπιδράσεων μεταξύ των εκλούμενων ενώσεων και των μορίων των διαλυτών της κινητής φάσης, την *υδροφοβικότητα*. Επιπλέον σημασία έχουν και οι αλληλεπιδράσεις των ενώσεων μεταξύ τους, ιδίως όταν στα απόνερα περιέχονται απορρυπαντικά, όπως είναι τα αστικά λύματα. Ενώσεις με υψηλή αλληλεπίδραση με το ύδωρ εκλούνται γρήγορα, ενώ όταν αυξάνει η σύσταση της κινητής φάσης με οργανικό διαλύτη, όπως είναι η μεθανόλη, εκλούνται αργότερα και το αντίθετο.



ΣΧΗΜΑ 3.45: Διαγράμματα του $\frac{d(\log A_{\lambda_i})}{d\lambda_i}$ έναντι του μήκους κύματος για τη χαμηλής

καθαρότητας κορυφή της ομάδας ΙΑ1 και το αντίστοιχο που προκύπτει από την προσομοίωση των κορυφών των ομάδων ΠΒ1, ΠΑ1 και ΠΑ2



B. Βαθμωτή έκλυση στο ίδιο δείγμα

Προκειμένου να επιτευχθεί πληρέστερος διαχωρισμός των συστατικών στο δείγμα, δοκιμάστηκε η τεχνική κλιμακούμενης αναλογίας δυαδικού συστήματος διαλυτών. Έτσι, βασιζόμενοι σε κάποια συμπεράσματα που ελήφθησαν από την ισοκρατική έκλυση, σχεδιάστηκε η βαθμωτή έκλυση ξεκινώντας από οργανικό διαλύτη και προσθέτοντας ύδωρ, ώστε να εκλουστούν στο χρωματογράφημα οι πολικές ενώσεις σε σχετικά μικρότερους χρόνους και οι ιοντικές σε σχετικά υψηλότερους χρόνους κατακράτησης, με στόχο ένα πιο άνετο διαχωρισμό, ενώ εφαρμόστηκε και η αντίθετη πορεία καθώς και συνδυασμοί ισοκρατικής/ βαθμωτής έκλυσης με ύδωρ και έναν από τους άλλους διαλύτες. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά τέσσερα μίγματα βαθμωτής έκλυσης, με δυαδικό σύστημα διαλυτών. Οι συνθήκες έκλυσης για το καθένα είναι οι εξής:

I. Ακετονιτρίλιο-ύδωρ

Στα πρώτα 7,5 min γίνεται ισοκρατική έκλυση με 100 % MeCN, στα 8 min αλλαγή σε MeCN-H₂O (90%-10%), στα 9 min αλλαγή σε 20%-80% MeCN-H₂O, ενώ ακολουθεί γραμμική βαθμωτή έκλυση μέχρι τα 17 min έως 100 % H₂O μεταβάλλοντας τη σύσταση κατά 10 %/1 min, και στα επόμενα από 18-25 min ισοκρατική έκλυση με H₂O. Το χρωματογράφημα που προέκυψε δίνεται στο σχήμα 3.46.

II. Μεθανόλη-ύδωρ

Ξεκινάει στα πρώτα 2 min με σύσταση MeOH-H₂O (5%-95%), στα 3 min γίνεται MeOH-H₂O (10%-90%), στα 4 min 80%20%, ενώ ακολουθεί μη-γραμμική βαθμωτή έκλυση μέχρι σύστασης MeOH-H₂O (75%-25%) στα 25 min. Το χρωματογράφημα που προέκυψε δίνεται στο σχήμα 3.47.

III. THF-ύδωρ

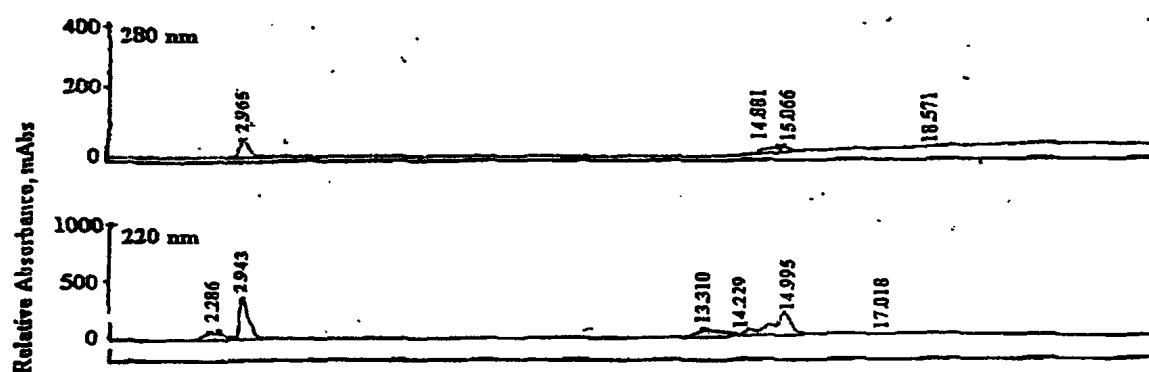
Ισοκρατική έκλυση στα πρώτα 2,5 min με THF-H₂O (90%-10%), από τα 2,5 min μέχρι τα 15 min μη γραμμική βαθμωτή έκλυση μέχρι σύστασης 100 % H₂O, μετά τα 15 min και μέχρι τα 20 min ισοκρατική έκλυση με 100 % H₂O.

IV. THF-ακετονιτρίλιο

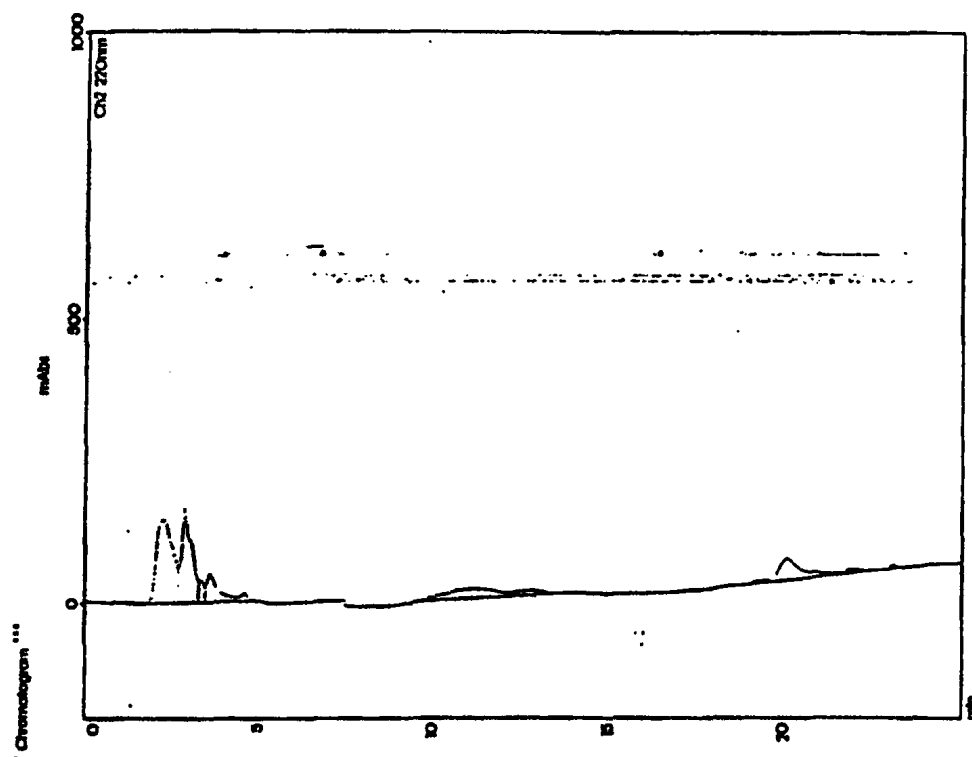
Ίδιες συνθήκες με το προηγούμενο με την μόνη διαφορά, ότι στη θέση του νερού είναι το MeCN.

Τα δύο πρώτα εκλουστικά δοκιμάστηκαν και χωρίς να γίνει έγχυση του δείγματος.





ΣΧΗΜΑ 3.46 Χρωματογράφημα κλιμακούμενης σύστασης μίγματος ακετονιτριλίου-ύδατος του αστικού λύματος



ΣΧΗΜΑ 3.47 Χρωματογράφημα κλιμακούμενης σύστασης μίγματος μεθανόλης-ύδατος του αστικού λύματος



Στον Πίνακα 22 δίνονται για όλα τα εκλουστικά, ο αριθμός των κορυφών και η καθαρότητα κάθε κορυφής στα 220, 260 και στα 280 nm.

Στην περίπτωση του εκλουστικού MeCN-H₂O, από τις επτά κορυφές, οι τρεις παρατηρούνται και στα τρία χρωματογραφήματα που λαμβάνονται με απορρόφηση στα μήκη κύματος 210, 220 και 280 nm, οι τρεις μόνο στο χρωματογράφημα των 220 nm και η μία μόνο στο χρωματογράφημα των 280 nm. Από τις κορυφές που ελήφθησαν, μόνο οι εκλούμενες σε χρόνους κατακράτησης 2,29, 2,94 και 15,00 min είναι πραγματικές κορυφές, αφού οι άλλες οφείλονται στο προφίλ του εκλουστικού, όπως αποδεικνύεται από το χρωματογράφημα που λαμβάνεται χωρίς το δείγμα του απόνερου. Παρατηρείται ότι διαφέρει από το 100 % MeCN στην ισοκρατική έκλυση (δεν υπάρχει η 2,58 min, ούτε η 2,87 min, ούτε η 3,20 min στα 280 nm, αλλά υπάρχει η 2,29 min στη θέση της.). Θα έπρεπε κανονικά να εμφανίζονταν οι ίδιες ακριβώς κορυφές. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη μεταβολή των αναλογιών των διαλυτών της κινητής φάσης που διαφοροποιεί το ιξώδες του εκλουστικού υγρού, καθώς επίσης στη διαφοροποίηση της απορρόφησης μεταξύ των μορίων των διαφορετικών διαλυτών στους χρόνους που γίνεται η μεταβολή των αναλογιών τους σύμφωνα με τον προγραμματισμό της έκλυσης. Φαίνεται ότι το χρωματογράφημα με την μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα λαμβάνεται με το δεύτερο εκλουστικό μέσο, αφού εκτείνεται μέχρι 21 min. Οι 4 πρώτες κορυφές που υπάρχουν και στα τρία μήκη κύματος, η 1 στα 220 και 280 nm, οι 2 μόνο στα 280 nm και 4 μόνο στα 220 nm. Στο χρωματογράφημα αυτό όλες οι κορυφές είναι πραγματικές, αφού το εκλουστικό από μόνο του δεν παρουσίασε καμία απολύτως κορυφή.

Το τρίτο εκλουστικό, έχει 7 κορυφές από τις οποίες μόνο 2 υπάρχουν σε όλα τα μήκη κύματος, οι 5 (μεταξύ των οποίων οι δύο πρώτες) μόνο στα 220 nm και 2 μόνο στα 280 nm. Το μίγμα αυτό απλώνει τις κορυφές. Οι κορυφές στα 17.18, 18.43 και 19.23 min έχουν πολύ χαμηλή ένταση.

Το τελευταίο εκλουστικό δίνει 9 κορυφές, από τις οποίες οι 2 υπάρχουν και στα τρία μήκη κύματος, οι 2 (η πρώτη και άλλη μία) μόνο στα 220 nm, οι 2 υπάρχουν στα 260 και 280 nm, άλλες 2 στα 220 και 280 nm, και άλλη 1 μόνο στα 280 nm. Το μίγμα αυτό δίνει πολύ καλή κλασμάτωση και κορυφές με υψηλή καθαρότητα, αλλά δεν είναι ευκρινή τα



φάσματα που παίρνουμε. Η διαφορά με το προηγούμενο δείχνει ότι με το ύδωρ παρασύρονται λίγο πιο νωρίς οι πολικές ενώσεις.

Το σχετικά μεγαλύτερης έντασης απορρόφησης συγκρότημα κορυφών για τα δυαδικά συστήματα διαλυτών I, II, III και IV παρατηρείται στους χρόνους κατακράτησης 2,94, 2,84, 2,75, 2,78 min, αντίστοιχα· υπάρχει σε όλα τα χρωματογραφήματα ανεξάρτητα από το είδος του δυαδικού μίγματος των διαλυτών της κινητής φάσης, καθώς από το μήκος κύματος στο οποίο παρακολουθείται η έκλυση, και έχει υψηλή καθαρότητα. Συμπερασματικά, μπορεί να λεχθεί για την ομάδα αυτών των κορυφών, ότι όταν εκλύεται με το ακετονιτρίλιο, η ένταση είναι πολύ μεγάλη, και το φάσμα παρουσιάζει μέγιστο στα 205 nm, ώμο γύρω στα 220-230 nm, ενώ απορροφά και στα 260-270 nm. Στα δυαδικά συστήματα διαλυτών τετραυδροφουρανίου-ακετονιτρίλιου ή τετραυδροφουρανίου-ύδατος η ένταση μειώνεται κατά τρεις έως τέσσερις φορές, έχει μέγιστο στα 220-225 nm και απορρόφηση στα 265 nm. Στο δυαδικό σύστημα διαλυτών ύδατος-μεθανόλης παρατηρείται στο φάσμα μέγιστο στα 202 nm και 260 nm. Άρα, το ακετονιτρίλιο αλλάζει το φάσμα και την ένταση, ενώ το τετραυδροφουράνιο μόνο το φάσμα σε σχέση με τη μεθανόλη-ύδωρ.



ΠΙΝΑΚΑΣ 22: Χρόνος κατακράτησης και καθαρότητα των χρωματογραφικών κορυφών που ελήφθησαν με απορρόφηση στα 220, 260 και 280 nm μετά από προγραμματισμένη βαθμωτή έκλυση με σύστημα δυαδικού διαλύτη διαφόρων αναλογιών μεταξύ των διαλυτών ακετονιτρίου, νερού, μεθανόλης και τετραϋδροφουρανίου για το ασπικό λύμα (t_R σε min)

MeCN/ύδωρ		MeOH/ύδωρ		THF/ύδωρ		THF/MeCN	
t_R	PP	t_R	PP	t_R	PP	t_R	PP
220 nm							
2.29	0.9900	2.23	0.9764	2.12	0.3602	2.22	0.7968
				2.40	0.5818		
				2.75	0.9801	2.78	0.9480
		2.84	0.9704				
2.94	0.9889						
		3.29	0.9907				
		3.58	0.0633				
		4.58	0.9969				
				10.33	0.7850	10.40	0.9074
		11.17	0.9865			11.17	0.9964
13.31	0.8995	12.84	0.9662				
14.23	0.9972			14.84	0.9755		
15.00	0.5518					15.73	0.9930
17.02	0.9930	17.18	0.8470			17.75	0.9860
		18.43	0.7577				
		20.11	0.9644				
260 nm							
		2.18	-				
2.96	0.9886	2.85	-	2.77	0.9929	2.79	0.9872
		3.29	-				
		3.58	-			11.17	0.9185
						12.31	0.7762
14.65	0.6889			14.83	0.9480	13.24	0.1114
15.04	0.9922						
280 nm							
		2.16	0.9573				
		2.85	0.9566	2.78	0.9929	2.80	0.9891
2.96	0.9869	3.30	0.9551				
		3.63	0.9991				
		11.52	0.9847			11.17	0.6221
						12.32	0.3174
		13.13	0.9329			13.24	0.1082
14.88	0.9905			14.83	0.9753		
15.07	0.0265					15.73	0.9910
						16.30	0.4187
18.57	0.1527			17.08	0.1506	17.95	0.7897
		19.23	0.9303				
		20.12	0.9975				



3.4.3 Σχόλια για τα φάσματα των κορυφών

Σύμφωνα με την ανάλυση σε συστάδες τα φάσματα των χρωματογραφικών κορυφών διαφοροποιούνται, με αποτέλεσμα να εμπίπτουν σε διαφορετικές κατηγορίες και υποκατηγορίες που η διαφορά τους μειώνεται όσο προχωρούμε και παραμένει σημαντική, όταν η παράμετρος της διαφοράς ως προς την μέγιστη είναι $> 20\%$.

Με αυτό τον τρόπο τα φάσματα των κορυφών (80) που επετεύχθησαν με τα διάφορα συστήματα διαλυτών και τις διάφορες αναλογίες των ξεχωρίζουν σε 10 κατηγορίες κορυφών για το αστικό απόνερο από τις οποίες οι 46 έχουν υψηλή καθαρότητα και οι 34 χαμηλή. Αν όμως παρατηρηθεί ο αριθμός των κορυφών των χρωματογραφημάτων που επιτυγχάνονται με οποιοδήποτε σύστημα διαλυτών, είναι πάντα μικρότερος του έξι ή επτά. Για παράδειγμα, οι κορυφές που εκλύονται με καθαρούς διαλύτες ύδωρ, μεθανόλη, και ακετονιτρίλιο είναι έξι, πέντε, και τέσσερις αντίστοιχα εκ των οποίων οι δύο μεγαλύτερες του νερού αντιστοιχούν σε μια κατηγορία (IIA2), οι τέσσερις της μεθανόλης σε μια κατηγορία (IIB1) και οι δύο μεγαλύτερες κορυφές του ακετονιτρίλιου σε μία κατηγορία (IB2). Συνεπώς, οι κατηγορίες των φασμάτων που προκύπτουν από την ανάλυση κατά συστάδες δεν είναι όλες αυθεντικές και μερικές από αυτές τις κατηγορίες εξαρτώνται από το σύστημα διαλυτών έκλυσης, ενώ άλλες είναι αποτέλεσμα της διαφοροποίησης των συστατικών του αστικού απόνερου που συγκροτούν το κλάσμα που εκλύεται με τη χρήση διαφορετικών συστημάτων διαλυτών.

Στα σχήματα 3.48, 3.49, και 3.50 δίνονται τα φάσματα των χρωματογραφικών κορυφών με εκλουστικό 100% ύδωρ, 10%-90% μεθανόλη-ύδωρ, και 10%-90% ακετονιτρίλιο-ύδωρ, αντίστοιχα. Από τα φάσματα αυτά γίνεται φανερό ότι:

Η έντονη απορρόφηση στα 200 nm αποκρύπτει τα χαρακτηριστικά του φάσματος που αναπτύσσονται πέραν από τα 210 nm με αποτέλεσμα οι μικρές χρωματογραφικές κορυφές να εμφανίζουν σαφές φάσμα UV-απορρόφησης, ενώ οι έντονες κορυφές να δείχνουν στο φάσμα τους μια απότομη μείωση της απορρόφησης χωρίς εμφανή χαρακτηριστικά φάσματος σε μεγαλύτερα μήκη κύματος.

Οι κλίσεις μείωσης της απορρόφησης στην περιοχή 200-205 nm είναι διαφορετικές στα διάφορα φάσματα και αυτό υποδεικνύει τη διαφορετική σύσταση σε μικρού μοριακού



βάρους ενώσεις των κλασμάτων των κορυφών που εκλούνται με διαφορετικό σύστημα διαλυτών.

Με την προσθήκη οργανικού διαλύτη στο εκλουστικό μέσο (μεθανόλης ή ακετονιτριλίου) τα φάσματα των κορυφών μικρής απορρόφησης τα έντονα χαρακτηριστικά των είναι εμφανή, αλλά μειωμένης απορρόφησης με την προσθήκη της μεθανόλης, και ακόμη περισσότερο μειωμένα με την προσθήκη του ακετονιτριλίου. Η μείωση αυτή μπορεί να οφείλεται στη διαφοροποίηση της σύστασης ή στην μερική απαλλαγή του κλάσματος έκλυσης από ενώσεις που έχουν μέγιστο απορρόφησης σε άλλη περιοχή και δίνουν υπόβαθρον απορρόφησης στην περιοχή αυτή. Οι τρεις τελευταίες από τις κορυφές αυτές έχουν φάσμα που έχει ώμο στα 225-240 nm με εκλουστικά μέσα 100% ύδωρ καθώς και 10%-90% μεθανόλη-ύδωρ, ενώ χάνουν τον ώμο αυτό με εκλουστικό μέσο 10%-90% ακετονιτρίλιο-ύδωρ. Αντίθετα, το φάσμα της πρώτης χρωματογραφικής εκλουόμενης κορυφής φαίνεται να μην επηρεάζεται από την σύσταση της κινητής φάσης στις αναλογίες αυτές.

Το ακετονιτρίλιο είναι απρωτικός διαλύτης και ηλεκτρονιόφιλη ένωση. Η μεθανόλη και το ύδωρ είναι ασθενείς πυρηνόφιλες ενώσεις και επειδή είναι πρωτικοί διαλύτες, κάνουν δεσμούς H, ενώ επιδιαλυτώνουν και τις πυρηνόφιλες βάσεις, μια διαδικασία που μοιάζει με τον δεσμό H. Οι αρωματικές ενώσεις που περιέχουν πυριδινικό N, αμινοομάδα, καρβοξυλική ομάδα και φαινολική ομάδα είναι πιο επιρρεπείς σε αλλαγή των φασμάτων τους με τους διάφορους διαλύτες καθώς και με την αλλαγή του pH. Από τα φάσματα που έγινε ανάλυση συμπλέγματος κορυφών σε επιμέρους μοναδικές κορυφές καθώς και από την βιβλιοθήκη φασμάτων UV διαφόρων ενώσεων^{160,161,162}, μπορούμε να πούμε τα εξής:

- 1) Τα φάσματα των τριών τελευταίων κορυφών μοιάζουν με φάσματα παραγώγων αρωματικών ενώσεων της κατηγορίας των φαινολών ή οξέων και με φάσματα αμινών. Πάντως, πρέπει να αντιστοιχούν σε αρωματικού τύπου ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές όταν βρίσκονται υπό την μορφή ανιόντων ή συζυγών βάσεων σε διαλύτη ακετονιτρίλιο γίνονται ουδέτερα μόρια ή κατιοντικά οξέα και η απορρόφηση του μέγιστου μετατοπίζεται κατά 25 nm, δηλαδή προκαλείται υψιχρωμία.
- 2) Τα φάσματα των δύο σχετικά μεγαλύτερης έντασης απορρόφησης κορυφών (που έχουν μία μπάντα απορρόφησης στην περιοχή των 260 nm με χαμηλή ένταση χωρίς βασική απορρόφηση σε μικρότερα μήκη κύματος δηλ. 200 έως 250 nm) δείχνουν την



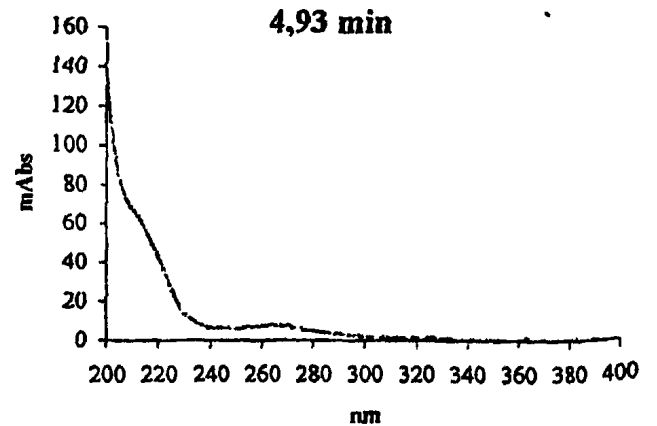
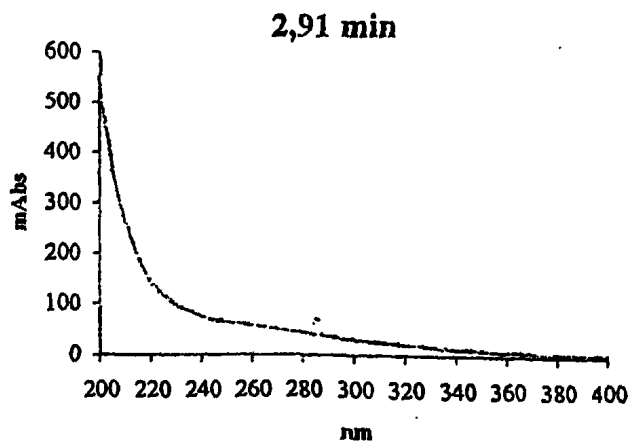
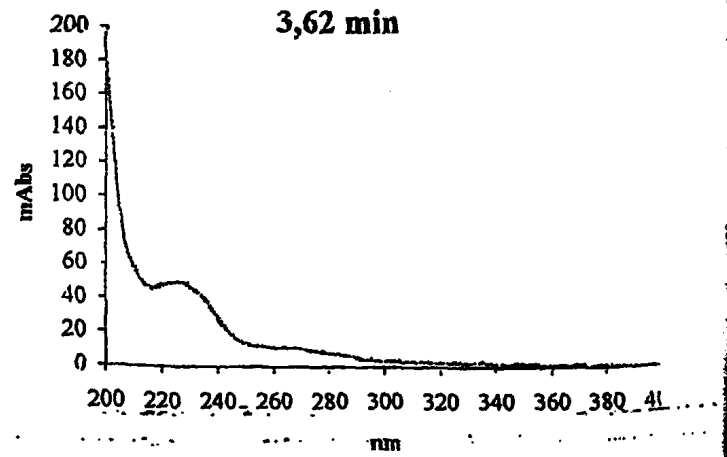
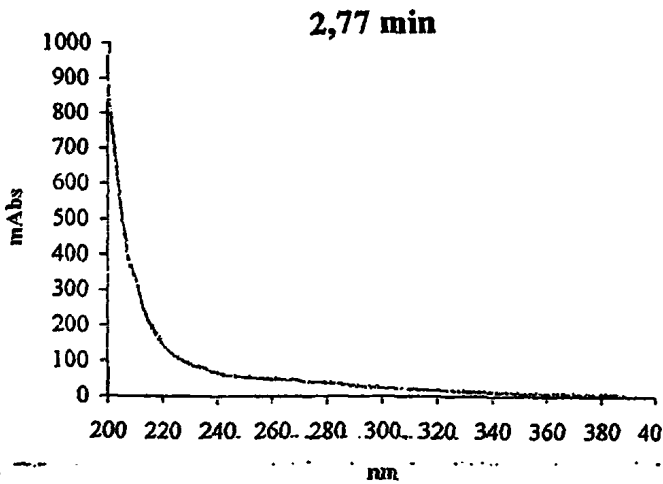
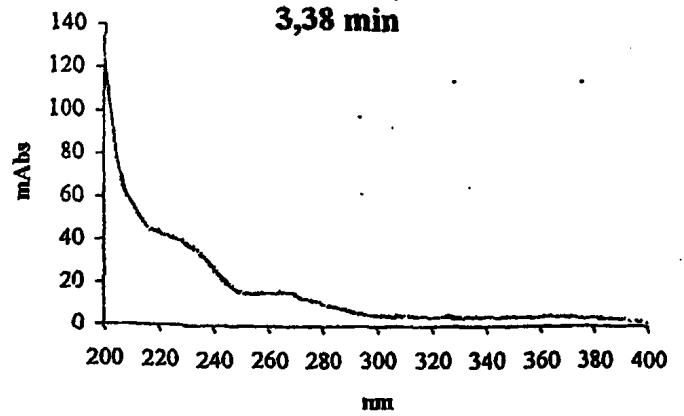
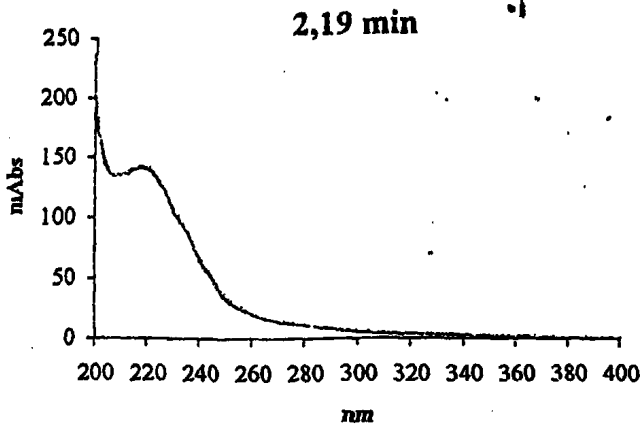
μετάπτωση $n \rightarrow \pi^*$ και φανερώνουν την ύπαρξη μιας απλής ή ασύζευκτης χρωμοφόρου ομάδας που περιέχει συνήθως άτομο O, N ή S). Θα πρέπει να αντιστοιχούν σε αζωτούχες βάσεις, όπως είναι οι πουρίνες και πυριμιδίνες. Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων είναι η κρεατινίνη, θεοφυλλίνη, θεοβρωμίνη, ουρικό οξύ, δηλαδή πουρίνες που είναι παραπροϊόντα του πρωτεϊνικού μεταβολισμού. Οι ενώσεις αυτές υπόκεινται σε ταυτομερισμό.

- 3) Η ένωση που εκλούεται πρώτη και είναι η πιο πολική από όλες, έχει ώμο στα 207 nm και στα 270 nm, πρέπει να είναι αρωματική.

Σε γενικές γραμμές με την τεχνική της Υγρής χρωματογραφίας Υψηλής απόδοσης ξεχωρίζουν τα αστικά λύματα σε:

- • ενώσεις που έχουν μέγιστο απορρόφησης < 200 nm και η απορρόφησή τους μειώνεται απότομα πάνω από τα 200 nm και είναι μικρού μοριακού βάρους όπως φαίνεται από την κλάσμάτωση με διαπίδυση αλλά και με την χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους,
- ενώσεις που έχουν σαφές φάσμα απορρόφησης με χαρακτηριστικά που αναπτύσσονται σε μήκη κύματος $>$ των 200 nm , και έχουν σχετικά μικρό μοριακό βάρος με χαρακτηριστικές χρωμοφόρες ομάδες (συζυγείς διπλούς δεσμούς, αρωματικούς δακτύλιους, αλδευδικές ομάδες κ.λ.π.) που έχουν μέγιστα απορρόφησης πάνω από τα 210 nm,
- ενώσεις που δίνουν φάσμα με μέγιστα σε μήκη κύματος < 200 nm και > 200 nm και είναι υψηλού μοριακού βάρους συστατικά όπως χουμικές ενώσεις, πρωτεϊνικές ενώσεις, πολυαρωματικές ενώσεις, σύμπλοκες ενώσεις, απορρυπαντικές ενώσεις κ.λ.π.

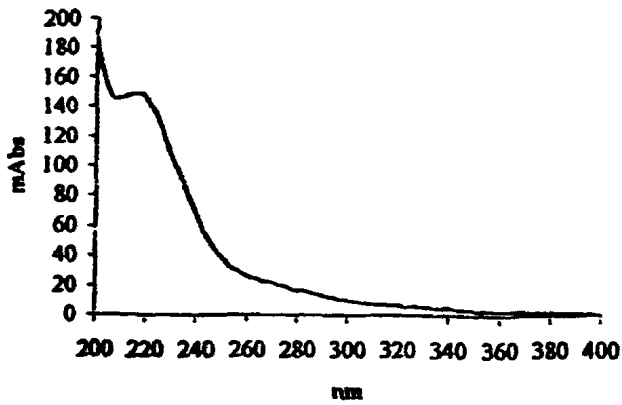




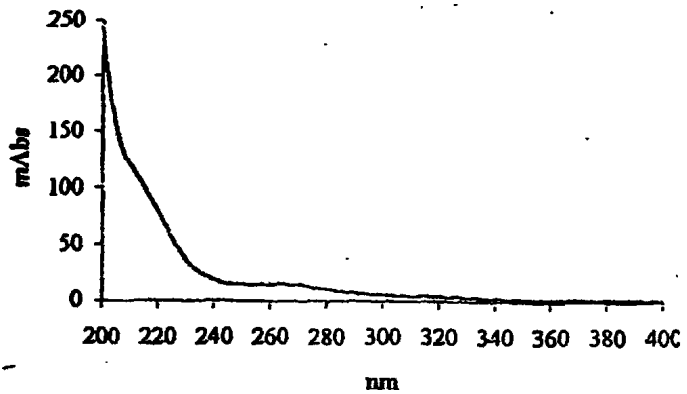
ΣΧΗΜΑ 3.48: UV φάσματα των κορυφών που εκλούσθηκαν με διαλύτη ύδωρ



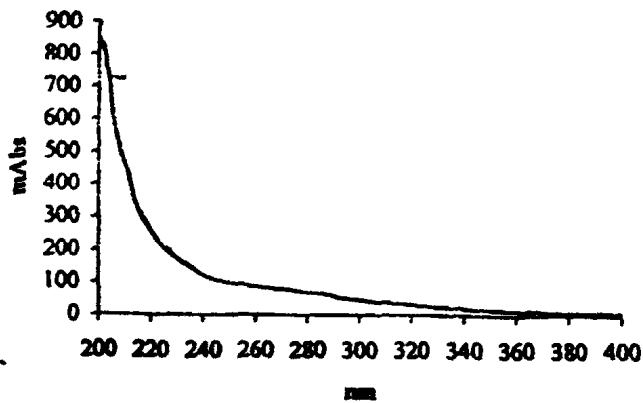
2,14 min



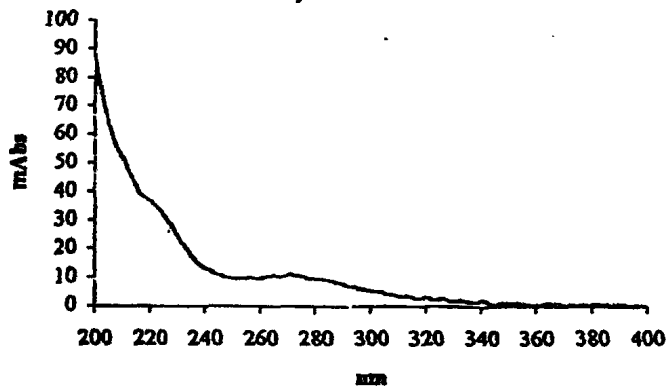
3,41 min



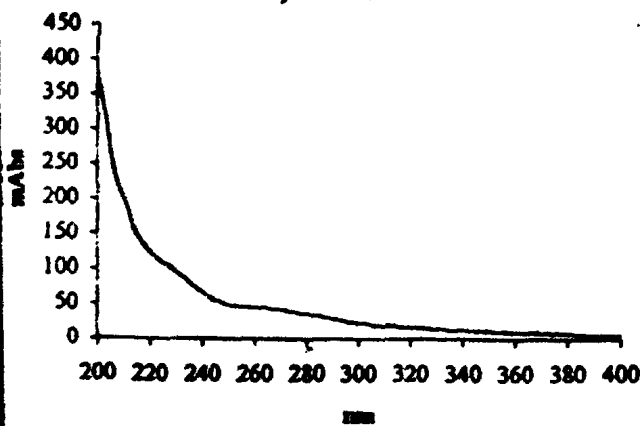
2,74 min



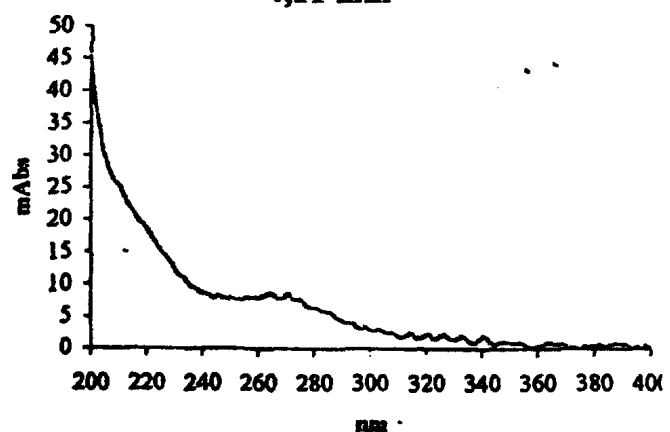
3,71 min



2,94 min

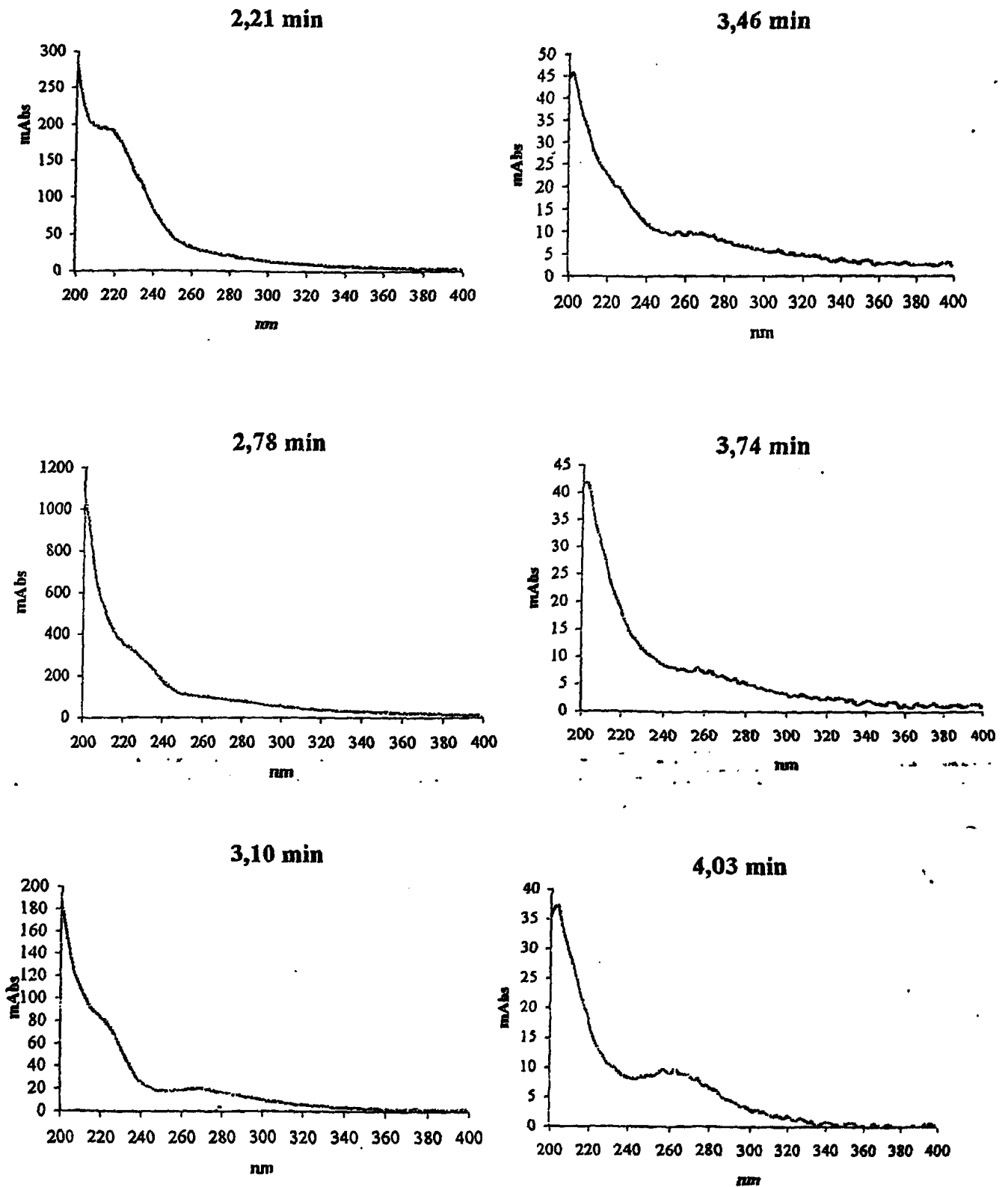


4,11 min



ΣΧΗΜΑ 3.49: UV φάσματα των κορυφών που εκλούσθηκαν με μίγμα μεθανόλης-ύδατος (10%-90%)





ΣΧΗΜΑ 3.50: UV φάσματα των κορυφών που εκλούσθηκαν με μίγμα ακετονιτρίλιου-ύδατος (10%-90%)



3.4.4 Ισοκρατική έκλυση βιομηχανικού απόβλητου

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης χρησιμοποιήθηκε επίσης και για την κλασμάτωση των συστατικών ενός αποβλήτου προερχόμενου από γαλακτοβιομηχανία.

Οι παράμετροι ποιότητας του αποβλήτου αυτού είναι οι εξής:

COD = 1925 mg/l

TNK = 57,4 mg/l

N-NH₄ = 28 mg/l

N-NO₃ = 8,3 mg/l

P-PO₄ = 17,8 mg/l

pH = 6,80

TSS = 488,2 mg/l

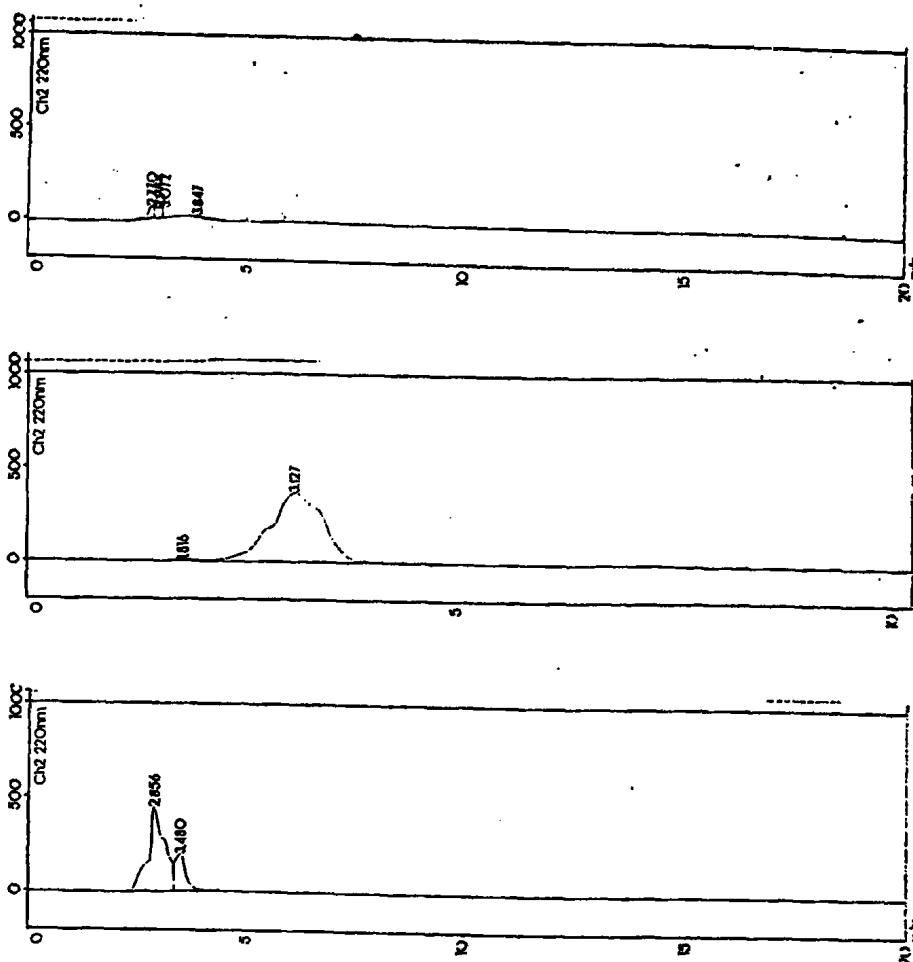
Η προετοιμασία του δείγματος είναι όπως έχει αναφερθεί στο πειραματικό μέρος, ενώ το δείγμα συμπυκνώθηκε περίπου 14 φορές, αφού έχει υψηλότερο COD από το αστικό λύμα.

3.4.4.1 Ισοκρατική έκλυση

Το δείγμα διαχωρίστηκε με ισοκρατική έκλυση με τους διαλύτες ύδωρ, μεθανόλη και ακετονιτρίλιο, καθώς και με τα δυαδικά μίγματα τους μεθανόλη-ύδωρ, ακετονιτρίλιο-ύδωρ και ακετονιτρίλιο-μεθανόλη. Το THF δεν χρησιμοποιήθηκε καθόλου, λόγω του ότι δεν έδειξε καθαρά φάσματα στο αστικό λύμα που χρησιμοποιήθηκε.

Στο σχήμα 3.51 (α-γ) δίνονται τα RP-HPLC χρωματογραφήματα με ανίχνευση της απορρόφησης στα 220 nm της ισοκρατικής έκλυσης του δείγματος με μοναδικό διαλύτη ύδωρ, μεθανόλη και ακετονιτρίλιο. Οι χρόνοι κατακράτησης και η καθαρότητα εκάστης κορυφής στα 220 και 280 nm δίνονται στους πίνακες 23, 24 και 25 για τα μίγματα διαλυτών μεθανόλη-ύδωρ, ακετονιτρίλιο-ύδωρ και ακετονιτρίλιο-μεθανόλη, αντίστοιχα.





ΣΧΗΜΑ 3.51: Χρωματογραφήματα ισοκραπικής έκλουσης βιομηχανικού αποβλήτου με διαλύτη (α) H_2O , (β) $MeOH$ και (γ) $MeCN$

Από το παραπάνω σχήμα βλέπουμε ότι καθένας διαλύτης δίνει ένα διαφορετικό προφίλ έκλουσης μέσα σε χρόνο 5 λεπτά. Ο αριθμός των ανιχνεύσιμων κορυφών καθώς και το παράθυρο χρόνου που εμφανίστηκε στο καθένα χρωματογράφημα ήταν για:

Το ύδωρ τέσσερις ανιχνεύσιμες κορυφές, όλες χαμηλής έντασης.

Η μεθανόλη δύο ανιχνεύσιμες κορυφές, εκ των οποίων η μία έχει πολύ χαμηλής ένταση (σχεδόν αμελητέα) και η άλλη υψηλή, ενώ είναι ταυτόχρονα πολύ φαρδιά κορυφή.

Το ακετονιτρίλιο δύο ανιχνεύσιμες κορυφές εκ των οποίων η μία έχει υψηλή ένταση και η δεύτερη μικρότερη.

Βλέπουμε ότι το ύδωρ δίνει τον μεγαλύτερο αριθμό κορυφών σε σχέση με την μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο που δίνουν ίδιο αριθμό κορυφών.



ΠΙΝΑΚΑΣ 23: Χρόνος κατακράτησης και καθαρότητα των κορυφών στα χρωματογραφήματα του βιομηχανικού λύματος που ελήφθησαν με απορρόφηση στα μήκη κύματος απορρόφησης 220 και 280 nm με το δυαδικό σύστημα διαλυτών ύδατος-μεθανόλης (t_R σε min)

% MeOH	t_R 220 nm	Καθαρό- τητα	t_R 280 nm	Καθαρό- τητα
100	1.82	0.8117	-	
			2.77	0.5661
	3.13	0.9824	3.18	0.9888
			3.38	0.0418
90	2.81		2.79	
	3.12		3.13	
			3.49	
70	2.88		2.87	
			3.03	
			3.45	
	4.06			
	4.30			
	4.88			
50	2.82		2.84	
	3.09		3.12	
	4.73		3.72	
	4.98			
30	2.78		2.82	
	3.03		3.04	
			3.24	
	3.48			
	3.79			
10	2.96		2.99	
			3.36	
	3.55			
0	2.77	0.0094	2.77	0.9948
	2.94	0.7775		
	3.07	0.9555		
	3.85	0.9988		
			5.84	0.9462



ΠΙΝΑΚΑΣ 24: Χρόνος κατακράτησης και καθαρότητα των κορυφών στα χρωματογραφήματα του βιομηχανικού λύματος που ελήφθησαν με απορρόφηση στα μήκη κύματος απορρόφησης 220 και 280 nm με το δυαδικό σύστημα διαλυτών ύδατος-ακετονιτριλίου (t_R σε min)

% MeCN	t_R	Καθαρότητα	t_R	Καθαρότητα
	220 nm		280 nm	
100			2.81	0.8719
	2.86	0.8912		
			3.36	0.9654
	3.48	0.2016		
90			2.84	0.9553
	3.18	0.9998	3.18	0.9985
			3.34	0.5294
	3.43	0.9712		
70	2.51	0.9990	2.54	0.9980
	2.79	0.9927	2.79	0.9806
50	2.52	0.9642	2.53	0.9707
30	2.65	0.9994	2.64	0.9994
	2.81	0.9665	2.81	0.9831
			3.40	0.9914
	4.30	0.8993		
10	1.53	0.9943	1.53	0.9943
	1.82	0.9977	1.82	0.9988
	2.19	0.9939	2.13	0.9988
			2.41	0.9987
	2.61	0.9984	2.60	0.9976
	3.21	0.9992		
	4.31	0.9639		
0	2.77	0.0094	2.77	0.9948
	2.94	0.7775		
	3.07	0.9555		
	3.85	0.9988		
			5.84	0.9462



ΠΙΝΑΚΑΣ 25: Χρόνος κατακράτησης και καθαρότητα των κορυφών στα χρωματογραφήματα του βιομηχανικού λύματος που ελήφθησαν με απορρόφηση στα μήκη κύματος απορρόφησης 220 και 280 nm με το δυαδικό σύστημα διαλυτών ακετονιτριλίου-μεθανόλης (t_R σε min)

% MeCN	t_R 220 nm	Καθαρό- τητα	t_R 280 nm	Καθαρό- τητα
100			2.81	0.8719
	2.86	0.8912		
			3.36	0.9654
	3.48	0.2016		
90	2.86	0.9979	2.85	0.9991
	3.09	0.9883	3.02	0.9918
	3.55	0.9988	3.59	0.9988
	3.82	0.9778	3.81	0.9995
			4.00	0.9329
70	2.88	0.9990	2.86	0.9972
	3.16	0.9997	3.10	0.9991
	3.44	0.9352	3.39	0.9986
50			2.86	0.9992
	3.21	0.9337	3.18	0.9996
			3.62	0.9446
30	2.91	0.9997	2.88	0.9995
	3.13	0.9998	3.14	0.9998
	3.29	0.9501		
			3.59	
10			2.90	0.9994
	3.36	0.9866	3.37	0.9641
0	1.82	0.8117		
			2.77	0.5661
	3.13	0.9824	3.18	0.9888
			3.38	0.0418



3.4.4.2 Εφαρμογή της Ανάλυσης σε συστάδες

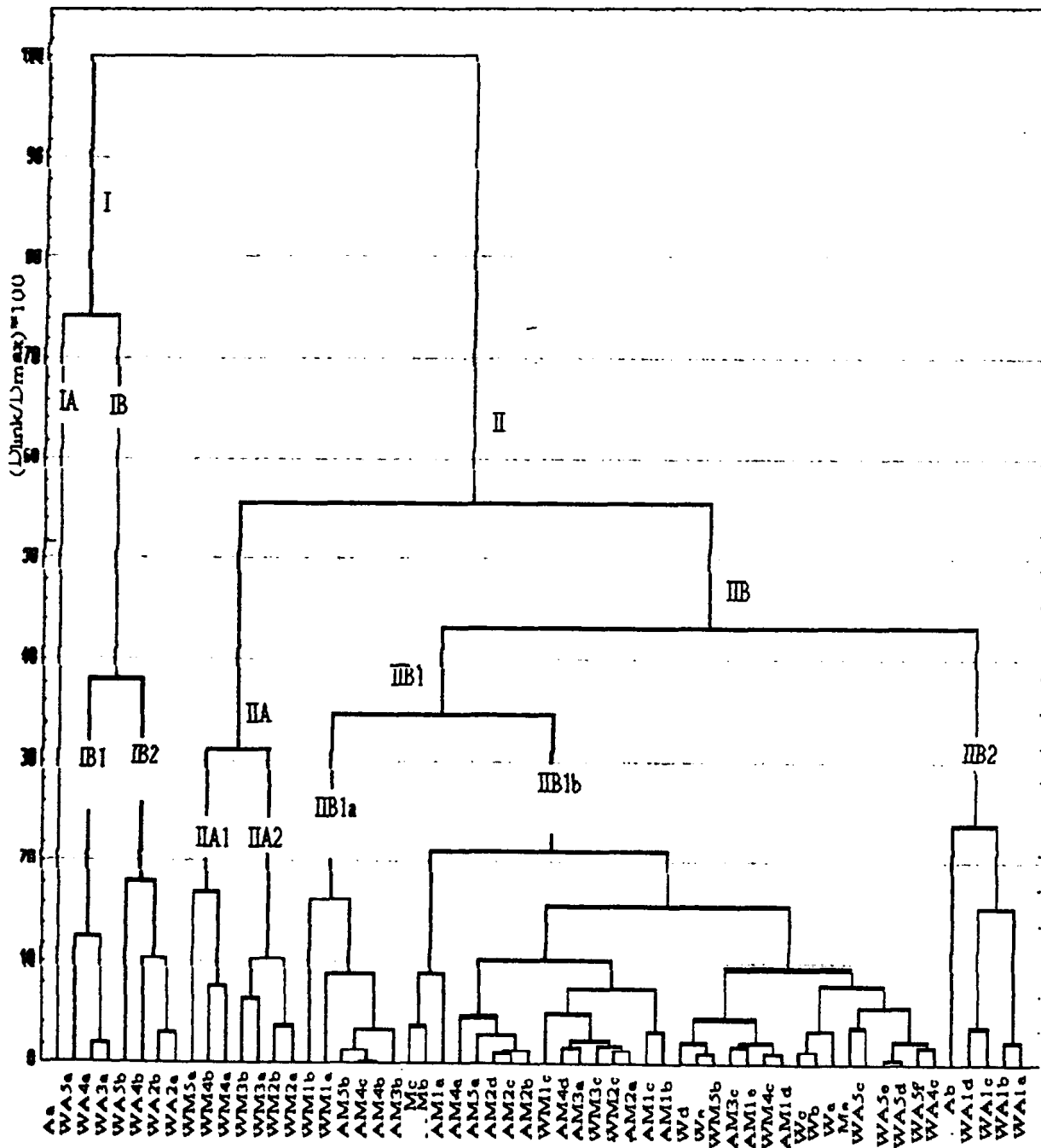
Οι 58 συνολικά κορυφές (σήματα) που ελήφθησαν από τα χρωματογραφήματα έχουν επεξεργασθεί με Ανάλυση σε συστάδες. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι κορυφές που βγαίνουν στον ίδιο χρόνο στα χρωματογραφήματα που πάρθηκαν στα τρία μήκη κύματος, τις οποίες θεωρήσαμε πραγματικές, και οι κορυφές που βγαίνουν στα δύο από τα τρία μήκη κύματος ή μόνο στο ένα μήκος κύματος που σημαίνει ότι μόνο σε αυτό απορροφάει. Τα αποτελέσματα δίνονται στο σχήμα 3.52. Οι συμβολισμοί των σημάτων έχουν όπως ακριβώς και στην περίπτωση του αστικού λύματος.

Από τους πίνακες 26, 27 και 28 βλέπουμε ότι δεν έχουμε αναστροφή της σειράς έκλυσης των ενώσεων, όπως συμβαίνει στο αστικό απόνερο. Όλες σχεδόν οι κορυφές έχουν πολύ υψηλές καθαρότητες. Οι ενώσεις που εκλύονται με μεθανόλη εκλύονται και με ύδωρ, αφού δείχνουν το ίδιο φάσμα. Το ύδωρ και η μεθανόλη παίζουν τον ίδιο ρόλο (εξάλλου έχουν παρόμοιες διπολικές ροπές, 1,85 και 1,70 Debye αντίστοιχα). Βέβαια, ο αριθμός των κορυφών είναι διαφορετικός (5 κορυφές με 100% ύδωρ και 3 κορυφές με 100% μεθανόλη). Το ακετονιτρίλιο εκλύει πολύ γρήγορα κάποιες ενώσεις με πολύ υψηλή απορρόφηση. Η έκλυση γίνεται σχεδόν στον νεκρό όγκο της στήλης. Η ιδιότητα που έχει το ακετονιτρίλιο είναι του ισχυρού διπόλου (διπολική ροπή 3,92 Debye). Άρα, αναπτύσσονται ισχυρές αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, που μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι ενώσεις αυτές πρέπει να είναι ισχυρά ιοντισμένες, όπως είναι π.χ. οι πρωτονιωμένες αμίνες.

Στο σχήμα 3.53 δίνονται τα φάσματα των κορυφών που προκύπτουν από τα χρωματογραφήματα με 10%-90% (ακετονιτρίλιο-ύδωρ). Από το σχήμα φαίνεται ότι οι δύο πρώτες κορυφές απορροφούν στα 201 (μέγιστο) και 280 nm, ενώ οι τέσσερις τελευταίες στα 211 nm και στα 230 nm.

Όσον αφορά τα σχήματα των φασμάτων, μπορούμε να πούμε ότι το φάσμα των δύο πρώτων κορυφών μοιάζει με το φάσμα των αρχικών κλασμάτων του βιομηχανικού λύματος με την μέθοδο της SEC (σελ.156). Οι ενώσεις που βγαίνουν με τα μίγματα μεθανόλης-ύδατος ή ακετονιτρίλιου-μεθανόλης ανήκουν σχεδόν στην ίδια ομάδα.





ΣΧΗΜΑ 3.52: Ανάλυση σε συστάδες των φασμάτων των HPLC-κορυφών του βιομηχανικού αποβλήτου

ΠΙΝΑΚΑΣ 26: Χρόνος κατακράτησης των φασματικών ομάδων στις οποίες κατηγοριοποιούνται - μετά από εφαρμογή της τεχνικής της ανάλυσης κατά συστάδες - οι χρωματογραφικές κορυφές που επετεύχθησαν με την αλλαγή της αναλογίας του εκλουστικού μέσου μεθανόλης-ύδατος

RT (min)	2.60	2.80	3.00	3.20	3.40	3.60	3.80	4.00	4.20	4.40	4.60	4.80	5.00	5.20	5.40	5.60	5.80	6.00
water-MeOH mixture (%)																		
100-0		ΠΒ1b	ΠΒ1b	ΠΒ1b			ΠΒ1b											ΠΒ1b
90-10			ΠΑ1		ΠΒ1b													
70-30		ΠΑ1	ΠΑ1		ΠΒ1b													
50-50		ΠΑ2	ΠΑ2				ΠΒ1b											
30-70		ΠΑ2	ΠΑ2		ΠΒ1b													
10-90		ΠΒ1a	ΠΒ1a		ΠΒ1b													
0-100		ΠΒ1b	ΠΒ1b		ΠΒ1b													



ΠΙΝΑΚΑΣ 27: Χρόνος κατακράτησης των φασματικών ομάδων στις οποίες κατηγοριοποιούνται - μετά από εφαρμογή της τεχνικής της ανάλυσης κατά συστάδες - οι χρωματογραφικές κορυφές που επετεύχθησαν με την αλλαγή της αναλογίας του εκλουστικού μέσου ακετονιτριλίου-ύδατος

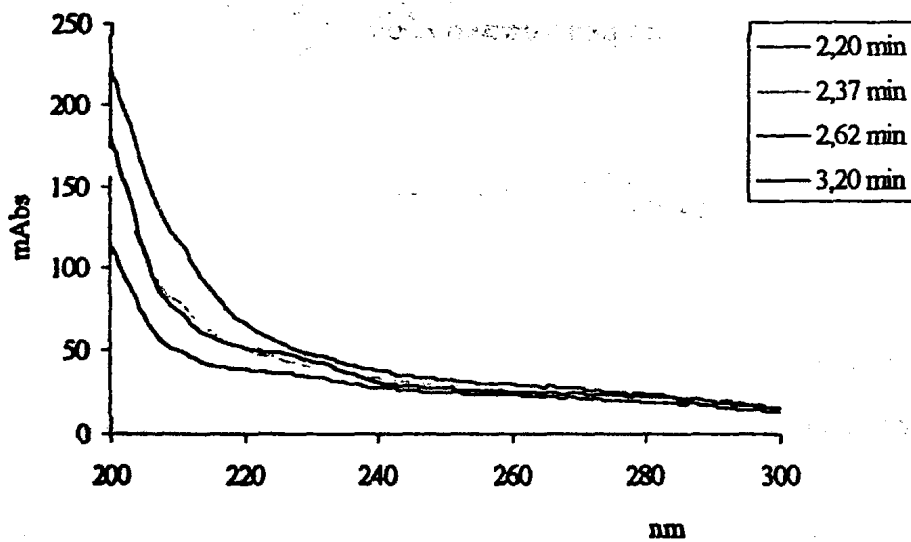
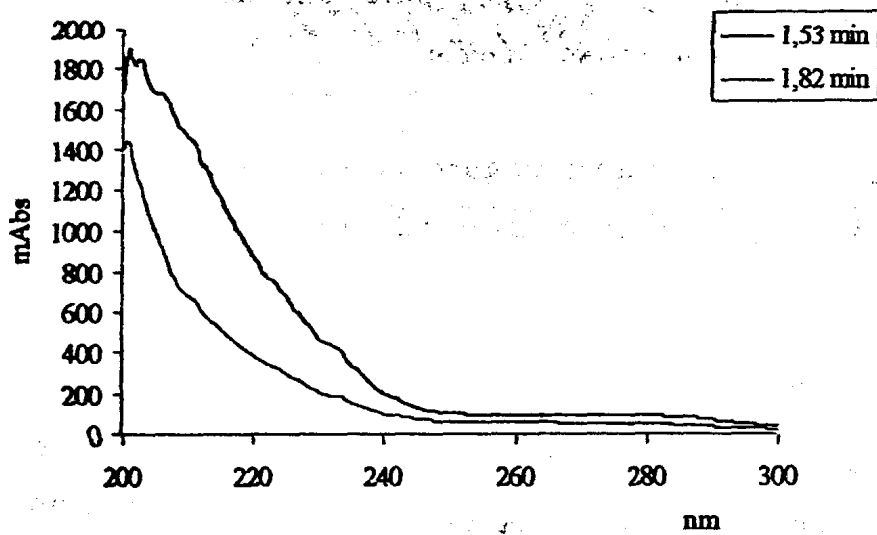
<u>RT (min)</u> <u>Water-MeCN</u> <u>mixture (%)</u>	1.50	1.75	1.90	2.05	2.20	2.35	2.50	2.75	2.90	3.05	3.20	3.35	3.50	3.75	3.90	4.05	4.20	4.35	4.50
100-0								ΠΒ1β	ΠΒ1β	ΠΒ1β					ΠΒ1β				
90-10	ΠΒ1	ΠΒ2			ΠΒ1β	ΠΒ1β	ΠΒ1β				ΠΒ1β								
70-30							ΠΒ1	ΠΒ2				ΠΒ1β							
50-50							ΠΒ1												
30-70							ΠΒ2	ΠΒ2											
10-90								ΠΒ2			ΠΒ2	ΠΒ2	ΠΒ2						
0-100									ΙΑ				ΠΒ2						



ΠΙΝΑΚΑΣ 28: Χρόνος κατακράτησης των φασματικών ομάδων στις οποίες κατηγοριοποιούνται - μετά από εφαρμογή της τεχνικής της ανάλυσης κατά συστάδες - οι χρωματογραφικές κορυφές που επετεύχθησαν με την αλλαγή της αναλογίας του του εκλουστικού μέσου ακετονιτριλίου-μεθανόλης

RT (min)	2.70	2.80	2.90	3.00	3.10	3.20	3.30	3.40	3.50	3.60	3.70	3.80	3.90	4.00
MeCN-MeOH mixture (%)														
100-0		IA						II B2						
90-10		II B1b			II B1b					II B1b		II B1b		II B1b
70-30		II B1b			II B1b	II B1b		II B1b						
50-50		II B1b				II B1a				II B1b				
30-70			II B1b		II B1a		II B1a			II B1b				
10-90			II B1b				II B1a							
0-100		II B1b			II B1b			II B1b						





ΣΧΗΜΑ 3.53: UV φάσματα του βιομηχανικού λύματος μετά από έκλυση μίγματος διαλυτών ακετονιτριλίου-ύδατος (10%-90%)



3.4.4.3 Σύγκριση διαφορετικότητας χρωματογραφημάτων και φασμάτων των κορυφών του αστικού και του βιομηχανικού λύματος

Αν συγκρίνουμε τα χρωματογραφήματα και τα φάσματα των κλασμάτων του αστικού και του βιομηχανικού λύματος, θα δούμε ότι παρουσιάζουν τις παρακάτω διαφορές και ομοιότητες

Διαφορές

- Ο αριθμός των κορυφών είναι διαφορετικός
- Τα σχήματα των φασμάτων είναι πολύ διαφορετικά
- Η ένταση των κορυφών είναι διαφορετική
- Το ακετονιτρίλιο στο μίγμα με το ύδωρ (10%-90) εκλύει πολύ γρήγορα τις κορυφές του βιομηχανικού λύματος σε σχέση με το αστικό λύμα

Ομοιότητες

- Το ύδωρ δίνει τις περισσότερες κορυφές
- Βγαίνουν όλες οι κορυφές στα πρώτα 5 λεπτά



ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν στην διδακτορική διατριβή προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Η μέθοδος των τεχνητών νευρωνικών δικτύων όπως εφαρμόστηκε απευθείας στα UV φάσματα είναι η πιο γρήγορη, παρέχει ικανοποιητική πρόβλεψη όσον αφορά την κατηγορία του λύματος.
- Η ανάλυση σε συστάδες απευθείας στα UV φάσματα ξεχωρίζει πολύ καλά τα αστικά λύματα από τα νοσοκομειακά.
- Η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης είναι ελαφρώς πιο αργή, αλλά μας παρέχει αρκετά καλό διαχωρισμό μεταξύ αστικών και βιομηχανικών λυμάτων.
- Η μέθοδος της χρωματογραφίας αποκλεισμού λόγω μεγέθους διακρίνει και τα τρία είδη λυμάτων μεταξύ τους είτε με βάση τα χρωματογραφήματα είτε με βάση τα φάσματα των SEC-κλασμάτων των.
- Η μέθοδος της διαπίδυσης είναι η πιο αργή από όλες τις άλλες μεθόδους, η πιο επίπονη και σχολαστική και μας παρέχει αφ' ενός μέτρια απόδοση στην κλασμάτωση των συστατικών των λυμάτων, αφ' ετέρου μέτρια ικανότητα πρόβλεψης της κατηγορίας του λύματος.
- Η εφαρμογή των χημειομετρικών μεθόδων στα UV φάσματα μετά από την κλασμάτωση των δειγμάτων με την χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους και με την υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ανάστροφης φάσης επιτυγχάνει να αναγνωρίσει την επιβάρυνση των αποβλήτων και να τα ξεχωρίσει μεταξύ τους.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα υγρά απόβλητα ή απόνερα είναι μίγματα που αποτελούνται από πολυάριθμες ενώσεις σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Απορρυπαντικά, λιπίδια, πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα, είναι κάποιες από τις κύριες κατηγορίες ενώσεων που υπάρχουν στα υγρά απόβλητα. Η ποιότητα των νερών και των απονέρων συνήθως εκτιμάται με τις συμβατικές μεθόδους, όπως είναι το Βιοχημικώς Απαιτούμενο Οξυγόνο, το Χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο, κ.α. Οι μέθοδοι αυτές είναι χρονοβόρες, απαιτούν ειδικό εξοπλισμό και πολλά αντιδραστήρια, και δεν παρέχουν συγκεκριμένες πληροφορίες για τα συστατικά των απονέρων. Η φασματοφωτομετρία απορρόφησης στην περιοχή του υπεριώδους (UV) έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό των απονέρων, χωρίς όμως να δίνει και αυτή συγκεκριμένες πληροφορίες αφού είναι ελάχιστες οι ενώσεις που έχουν φάσματα με διακριτές κορυφές. Ο συνδυασμός όμως της UV φασματοφωτομετρίας με την κλασμάτωση των συστατικών των αποβλήτων θα μπορούσε να δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Κατάλληλες μέθοδοι κλασμάτωσης που έχουν χρησιμοποιηθεί, όπως φαίνεται από την βιβλιογραφία, είναι η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους, ο διαχωρισμός με τις μεμβράνες διαπίδωσης και η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης.

Οι χημειομετρικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την επίλυση πολλών χημικών προβλημάτων. Μία αντιπροσωπευτική μέθοδος της μάθησης με επίβλεψη, τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα, και μία αντιπροσωπευτική μέθοδος της μάθησης χωρίς επίβλεψη, η ανάλυση σε συστάδες, έχουν χρησιμοποιηθεί για τη επεξεργασία των UV φασματικών δεδομένων είτε απευθείας είτε κατόπιν κλασμάτωσης με τις μεθόδους που αναφέρθηκαν. Όλα τα παραπάνω περιγράφονται αναλυτικά στο πρώτο κεφάλαιο της διδακτορικής διατριβής, την εισαγωγή.

Ο σκοπός της διδακτορικής διατριβής είναι να απομονωθεί το περιεχόμενο οργανικό υλικό των αποβλήτων ώστε να χαρακτηριστούν τα υγρά απόβλητα και να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με την προέλευσή τους.

Στο δεύτερο κεφάλαιο, το πειραματικό μέρος, περιγράφονται τα ακόλουθα: η συλλογή των δειγμάτων, η διατήρηση και η προεπεξεργασία τους, οι πειραματικές συνθήκες που



εφαρμόστηκαν στις τεχνικές κλασμάτωσης, καθώς και η επεξεργασία των δεδομένων με τις χημειομετρικές μεθόδους.

Στο τρίτο κεφάλαιο παρουσιάζονται όλα τα αποτελέσματα. Αρχικά, δίνονται οι παράμετροι ποιότητας των λυμάτων, όπως προσδιορίστηκαν με τις συμβατικές μεθόδους ανάλυσης. Ακολουθεί, η επεξεργασία των UV δεδομένων με την μέθοδο των τεχνητών νευρωνικών δικτύων που είναι μεν γρήγορη, αλλά έδειξε όμως ικανότητα ταξινόμησης των δειγμάτων 77%. Η επεξεργασία των ίδιων δεδομένων με την ανάλυση σε συστάδες ξεχώρισε τα αστικά από τα νοσοκομειακά απόβλητα. Τα βιομηχανικά απόβλητα και τα επιφανειακά νερά διαμοιράστηκαν το ίδιο στις δύο κατηγορίες.

Οι μεμβράνες διαπίδυσης που χρησιμοποιήθηκαν είχαν όρια αποκλεισμού μοριακού βάρους 12000 και 500. Η μέθοδος δεν έδειξε καλά αποτελέσματα στις ενώσεις αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν. Τα UV φάσματα των κλασμάτων των δειγμάτων που ελήφθησαν έδειξαν μεν διαφορές όχι όμως αρκετά διακριτές. Τα UV φάσματα των δειγμάτων φάνηκε ότι μοιάζουν περισσότερο με τα UV φάσματα των ενώσεων που έχουν MB μικρότερο από 12000. Με την επεξεργασία των δεδομένων με την ανάλυση σε συστάδες ξεχώρισαν τα επιφανειακά νερά, όχι όμως οι άλλες κατηγορίες δειγμάτων. Γενικά, η κλασμάτωση με τις μεμβράνες διαπίδυσης δεν έδειξε ικανοποιητικά αποτελέσματα, και επειδή είναι πολύ χρονοβόρα και επίπονη μέθοδος δεν διευκολύνει την επίτευξη του σκοπού της διατριβής.

Στην χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους χρησιμοποιήθηκαν δύο στήλες με υλικά Sephadex G-25 και Sephadex G-15. Τα όρια αποκλεισμού MB των υλικών αυτών είναι αντίστοιχα 5000 και 1500. Για την βαθμονόμηση των στηλών χρησιμοποιήθηκαν πεπτίδια διαφόρων MB. Τελικά, αποκλείστηκε η δεύτερη στήλη και η κλασμάτωση των δειγμάτων έγινε με τη πρώτη στήλη. Τα τρία είδη αποβλήτων ξεχώρισαν επιτυχώς όπως φάνηκε από τα UV φάσματα των κλασμάτων και από την επεξεργασία των δεδομένων με την ανάλυση σε συστάδες. Έτσι, η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους αποδείχθηκε ότι είναι πολύ σημαντική μέθοδος για την κατηγοριοποίηση των αποβλήτων.

Το πρωτόκολλο υγρής χρωματογραφίας ανάστροφης φάσης αποδείχθηκε επίσης ικανό για να κλασματώσει τις υδατοδιαλυτές ενώσεις του δείγματος και η επεξεργασία των UV δεδομένων με τις χημειομετρικές μεθόδους να ξεχωρίσει τα ιδανικά φάσματα από άλλα και περαιτέρω να ανακαλύψει τις συνεισφορές των αυθεντικών φασμάτων στα φάσματα



των χαμηλής καθαρότητας κορυφών. Είναι ένα χρήσιμο εργαλείο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με UV φασματικές βάσεις δεδομένων ώστε να προσδιοριστούν οι οργανικές ενώσεις ή τα ανόργανα εκείνα ιόντα που απορροφούν και υπάρχουν στα υγρά απόβλητα.

Στο παράρτημα, παρουσιάζονται οι βασικές αρχές των μεθόδων κλασμάτωσης που χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης, της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους και του διαχωρισμού με μεμβράνες διαπίδυσης.



SUMMARY

Wastewaters are mixtures comprised of numerous compounds in very low concentrations. Detergents, lipids, proteins, nucleic acids are some of the main categories of compounds found in wastewaters. The quality of water and wastewater samples has been usually evaluated by conventional methods of analysis, such as Biochemical oxygen demand, Chemical oxidant demand, etc. These methods are time consuming, need specific apparatus and many reagents, and do not provide specific information about the constituents of the wastewaters. UV spectrophotometry has been also used to characterize the wastewaters but is not able to separate the one multicomponent mixture from the other. This is due to the fact that only a few compounds have spectra with discrete peaks. The combination of UV spectrophotometry with the fractionation of the constituents of a wastewater sample could give satisfactory results. Suitable methods for fractionation are size exclusion chromatography, separation with dialysis membranes and high performance liquid chromatography.

Chemometric methods have been used to solve chemical problems such as pattern recognition. A representative method of supervised learning, the artificial neural networks (ANN) and a representative method of unsupervised learning, the cluster analysis (CA) were used either immediately to the UV spectral data or after fractionation with separation methods.

All the above are described in the first chapter of the doctoral research, the introduction. The aim of this doctoral research is to isolate the organic matter in order to characterize the wastewaters and to classify them into groups according to their origin.

The second chapter, the experimental part, includes the following: the collection of samples, the storage and pretreatment of the samples, the experimental conditions for the fractionation methods and the processing of the data with the chemometric methods.



In the third chapter the results are displayed. First, the quality parameters are shown as were determined by the standard methods of analysis. The treatment of the UV data with the very rapid ANN method, showed a classification ability of 77%. The application of cluster analysis (CA) to the same results separated the municipal from the hospital wastewaters. The industrial and the surface waters were spread between these two categories.

The dialysis membranes that were used had MW Cut-Off values of 12000 and 500. First, standard compounds were dialyzed and the results were not satisfactory. The UV spectra of the fractions of the samples that were dialyzed showed differences between each other but not discrete enough. The shapes of the UV spectra of the samples were similar with the UV spectra of the compounds with MW less than 12000. The treatment of the UV data with the CA method separated the surface waters from the other kinds of wastewaters. Generally, the fractionation with the dialysis membranes did not give good results, and together with the fact that is a very slow method, it is not recommended for the aim of the research.

Size exclusion chromatography was conducted with two columns: one with Sephadex G-25 and the other with Sephadex G-15 which had MW exclusion limits 5000 and 1500, respectively. The columns were calibrated by a set of peptides with several MWs. Only, the first column was used for the fractionation of the samples. The three kinds of wastewaters were classified successfully as is shown from the UV spectra of their fractions and from the processing of the data with cluster analysis. Size exclusion chromatography has proved to be a very efficient method for the classification of the wastewaters.

The reversed phase liquid chromatography protocol seemed to be able to separate the water soluble compounds of a sample and the chemometric characterization of UV spectra to separate identical spectra from the different ones, and further to find out contributions of authentic spectra to low peak purity of some peaks. It is a useful tool that can be used in connection with UV spectral data-bases to identify main organic compounds of inorganic anions that absorb in the UV region of a wastewater sample.



In the appendix, the basic theoretical principles of the fractionation methods high performance liquid chromatography, size exclusion chromatography and separation with dialysis membranes are described.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



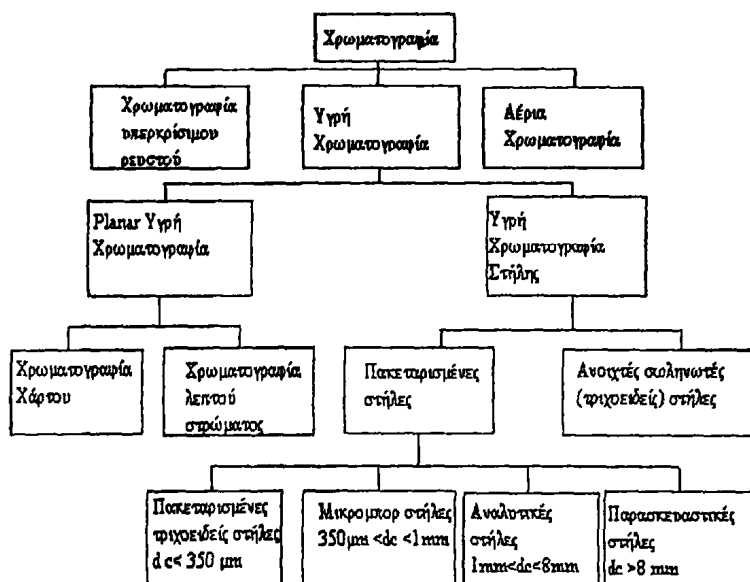
Α. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ

1. Θεωρία

Ο όρος υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιείται για να περιγράψει τον διαχωρισμό ενώσεων που υπάρχουν σε ένα διάλυμα, που οφείλεται στην διαφορετική ταχύτητα μετανάστευσης κάθε ένωσης στην κινητή φάση που ρέει διαμέσου μιας στήλης πακεταρισμένης με στερεά σωματίδια^{157,163,164}. Επίσης, εφαρμόζεται στην πιο πρόσφατη ανάπτυξη παρόμοιας διαφορικής μετανάστευσης που γίνεται σε έναν ανοιχτό σωλήνα. Ξεχωρίζει από την αέρια χρωματογραφία (gas chromatography) και την υπερκρίσιμου ρευστού χρωματογραφία (supercritical fluid chromatography) από την κατάσταση της κινητής φάσης στην θερμοκρασία και την πίεση του συστήματος. Μιλώντας με την αυστηρή έννοια η χρωματογραφία λεπτού στρώματος (thin layer chromatography), η χρωματογραφία χάρτου (paper chromatography) και η χρωματογραφία καταβύθισης (centrifugation chromatography) είναι μορφές υγρής χρωματογραφίας και οι μηχανισμοί διαχωρισμού είναι οι ίδιοι.

Η στατική φάση υποστηρίζεται από μία κλίνη σπηρικτικού υλικού που συνίσταται είτε από σφαιρικά ή ακανόνιστης μορφής τεμαχίδια πακεταρισμένα σε ανοξείδωτο σωλήνα ή επικολλημένα στην εσωτερική επιφάνεια ενός σιλικονούχου τριχοειδούς σωλήνα. Οι διάμετροι των σωματιδίων (d_p) ποικίλλουν από 1 έως 37 μm , με πιο συνήθη τα μεγέθη 5 και 10 μm για τους αναλυτικούς διαχωρισμούς και τα $d_p > 10 \mu\text{m}$ για παρασκευαστικούς σκοπούς. Η παρασκευαστική γίνεται συνήθως σε στήλες με εσωτερική διάμετρο d_c μεγαλύτερη από 8 mm. Η αναλυτική γίνεται σε στήλες όπου το d_c κυμαίνεται από 8 έως 350 μm . Η μικροστήλη γίνεται σε στήλες με $d_c < 1\text{mm}$. Η ανοιχτή σωληνωτή γίνεται σε τριχοειδείς σωλήνες χαλαζία με d_c από 50 έως 5 μm . Στο σχήμα 1 απεικονίζονται οι μορφές χρωματογραφίας.





ΣΧΗΜΑ 1: Μορφές Χρωματογραφίας

2. Ορολογία

Η επίπεδη υγρή χρωματογραφία μπορεί άνετα να χωριστεί σε χρωματογραφία χάρτου (PC) και λεπτού στρώματος χρωματογραφία (TLC) όπου η στατική φάση συνδέεται σαν ένα λεπτό φιλμ στην επίπεδη επιφάνεια γυαλιού ή αλούμινας. Η χρωματογραφία χάρτου έχει αντικατασταθεί από πιο σύγχρονες μεθόδους ενώ η χρωματογραφία λεπτού στρώματος χρησιμοποιείται ευρέως για την ποιοτική ανάλυση και για παρασκευαστικούς σκοπούς. Η TLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης και για ποσοτική ανάλυση, αλλά η υγρή χρωματογραφία στήλης είναι πιο αποτελεσματική και γρήγορη για τον ίδιο σκοπό. Στην επίπεδη υγρή χρωματογραφία η κινητή φάση περνάει μέσω της στατικής φάσης με την βοήθεια τριχοειδών δυνάμεων ή λιγότερο σύνθητες με φυγοκεντρικές δυνάμεις.

Η υγρή χρωματογραφία στήλης (column liquid chromatography) μπορεί να διαχωριστεί σε εκείνα τα συστήματα που χρησιμοποιούν πακεταρισμένες στήλες και σε εκείνα που χρησιμοποιούν ανοιχτούς σωλήνες. Οι τριχοειδείς σωλήνες ($d_c < 350 \mu\text{m}$) χρησιμοποιούνται στην ανοιχτή χρωματογραφία και η στατική φάση είναι επιστρωμένη στην εσωτερική επιφάνεια. Τα συστήματα πακεταρισμένης στήλης

μπορεί να υποδιαιρεθούν σε τριχοειδείς στήλες, μικροστήλες, αναλυτικές στήλες και παρασκευαστικές στήλες σύμφωνα με την εσωτερική διάμετρο που έχει η στήλη.

Η κινητή φάση στην χρωματογραφία στήλης ρέει μέσω της στήλης σαν αποτέλεσμα δυνάμεων βαρυντικών, μηχανικών (άντληση) ή ηλεκτρικών. Η διαβάθμιση στην βαρυντική ή μηχανική πίεση δίνει ένα τυρβώδες προφίλ ροής που είναι και το κύριο αίτιο για την διεύρυνση της μπάντας στην υγρή χρωματογραφία. Η ηλεκτρικά οδηγούμενη χρωματογραφία είναι πιο ελκυστική για την δημιουργία ροής στην υγρή χρωματογραφία επειδή δίνει ένα επίπεδο προφίλ. Ένα επίπεδο προφίλ ροής επιτρέπει υψηλή απόδοση στην στήλη σε σύντομους χρόνους ανάλυσης. Το μόνο μειονέκτημα της ηλεκτρικά προκαλούμενης χρωματογραφίας είναι ότι πρέπει να γίνεται σε ανοιχτούς ή πακεταρισμένους τριχοειδείς σωλήνες για να ελαχιστοποιούνται οι επιδράσεις από την διαβάθμιση της θερμοκρασίας.

3. Επιλογή της χρωματογραφικής μεθόδου

Η στρατηγική που ακολουθείται για την επιλογή της σωστής μεθόδου αποτελείται από τα τέσσερα παρακάτω βήματα: α) επιλογή του είδους χρωματογραφίας, β) επιλογή της στήλης και των διαστάσεών της, γ) ρύθμιση της ισχύος του εκλουστικού ώστε να επιτευχθεί ένα k' μεταξύ 2 και 10 και δ) ρύθμιση της εκλεκτικότητας ώστε $R_s \geq 1,50$. Επειδή είναι πιο εύκολη η αλλαγή της κινητής φάσης από την αλλαγή της στατικής, πρέπει να δοθεί έμφαση στην βελτιστοποίηση της σύστασης της κινητής φάσης. Εξαιρέση σε αυτό αποτελεί η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους όπου η απόδοση στον διαχωρισμό βασίζεται στις διαφορές στα μοριακά μεγέθη περισσότερο από ότι στην κατανομή των ενώσεων μεταξύ κινητής και στατικής φάσης.

Ο μηχανισμός διαχωρισμού στην χρωματογραφία βασίζεται στο μοριακό βάρος, στο σημείο ζέσεως, την πολικότητα και τον ιοντικό χαρακτήρα των ενώσεων. Άλλοι παράγοντες που μπορούν να ληφθούν υπόψη στην επιλογή του είδους της χρωματογραφίας είναι η φύση του δείγματος καθώς και εάν ο διαχωρισμός γίνεται για παρασκευαστικό ή αναλυτικό σκοπό. Για παράδειγμα οι μη πολικές ενώσεις διαχωρίζονται καλύτερα με χρωματογραφία κανονικής φάσης. Ένας άλλος παράγοντας είναι το κόστος, αφού οι στήλες που χρησιμοποιούνται για παρασκευαστικό σκοπό χρειάζονται για την πλήρωσή τους μεγάλη ποσότητα υλικού.

Η πυριτία είναι οικονομικό υλικό εάν χρησιμοποιηθεί για παρασκευαστικούς σκοπούς.

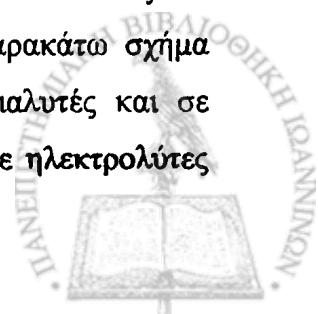


Παραδοσιακά, η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) συστήνεται για ενώσεις που έχουν $MB > 1000$ και εξακολουθεί να αποτελεί την μέθοδο επιλογής για την κατανομή μεγέθους των πολυμερών. Υπάρχουν βέβαια και άλλες επιλογές για τον αναλυτικό και παρασκευαστικό διαχωρισμό βιοπολυμερών όπως πρωτείνες, πεπτίδια ή ολιγονουκλεοτίδια. Άλλες μέθοδοι που δεν αποδιατάσσουν είναι η ιοντική χρωματογραφία και η χρωματογραφία υδρόφοβης αλληλεπίδρασης. Τα συνήθη χρωματογραφικά συστήματα ανάστροφης φάσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών, αλλά οι στήλες πρέπει να έχουν υλικό με μεγάλη διάμετρο πόρων, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση αποδιατάσσουν τις πρωτείνες.

Οι κύριοι παράγοντες που παίζουν ρόλο για τον διαχωρισμό μικρών μορίων ($MB < 1000$) είναι ο ιοντικός χαρακτήρας και η πολικότητα. Οι ιοντικές διαχωρίζονται καλά με ιοντική χρωματογραφία, με ανάστροφης φάσης χρωματογραφία ή με χρωματογραφία ζεύγους ιόντων. Γενικά, η δεύτερη προτιμάται από την πρώτη επειδή πετυχαίνουμε μεγαλύτερες αποδόσεις στην στήλη, εύκολη ανίχνευση και υπάρχουν περισσότερες επιλογές για τους διαχωρισμούς.

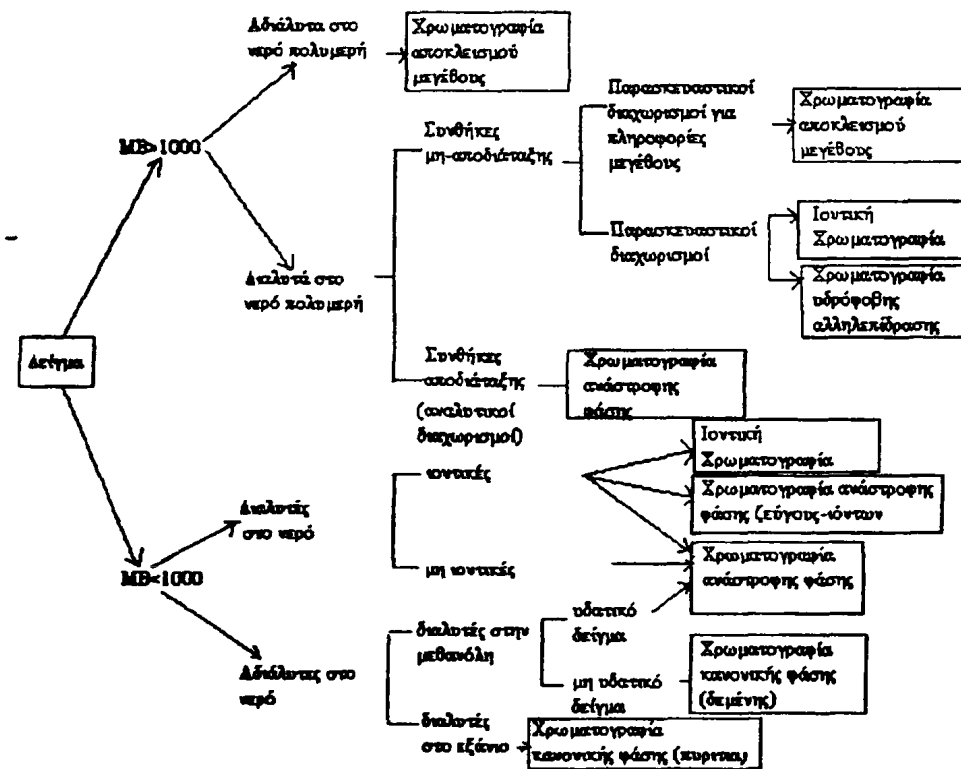
Η παράμετρος διαλυτότητα (δ) έχει βρεθεί ότι είναι ένα χρήσιμο μέτρο της πολικότητας στην υγρή χρωματογραφία¹⁶⁵. Για μία δεδομένη ένωση i , που εκλύεται με τιμή k' μεταξύ 2 και 10, η πολικότητά της δ_i πρέπει να βρίσκεται μεταξύ της πολικότητας της κινητής φάσης δ_m και της πολικότητας της στατικής φάσης δ_s . Στην κανονικής φάσης χρωματογραφία η τιμή δ_s για την σίλικα είναι 16 και η τιμή δ_m για το εξάνιο, την λιγότερο πολική κινητή φάση είναι 7,0. Στην ανάστροφης φάσης χρωματογραφία η τιμή δ_s για έναν υδρογονάνθρακα όπως το ODS είναι περίπου 7,0, ενώ η τιμή δ_m για το νερό, την πιο πολική από τις κινητές φάσεις είναι 23,4. Οι περισσότερες εφαρμογές στην υγρή χρωματογραφία περιλαμβάνουν τον διαχωρισμό οργανικών ενώσεων που το δ_i τους ποικίλλει από 8 για τις μη πολικές ενώσεις όπως είναι τα λιπαρά οξέα μέχρι και 16 για τις πολύ πολικές ενώσεις όπως η 2-υδροξυφαινόλη. Αυτή η ευρεία κλίμακα σε πολικότητα συνδυαζόμενη με την συμβατότητα των υδατικών δειγμάτων εξηγεί γιατί η ανάστροφης φάσης χρωματογραφία μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τόσους διαχωρισμούς.

Πάντως και η διαλυτότητα των ενώσεων στο νερό, στην μεθανόλη και στο εξάνιο μπορεί να οδηγήσει στον σωστό διαχωρισμό των ενώσεων. Το παρακάτω σχήμα δείχνει ότι οι ενώσεις που έχουν $MB < 1000$ διαχωρίζονται σε διαλυτές και σε αδιάλυτες στο νερό. Οι διαλυτές στο νερό ενώσεις διαχωρίζονται σε ηλεκτρολύτες



και μη ηλεκτρολύτες. Οι μη ηλεκτρολύτες μπορούν να διαχωριστούν επιτυχώς με την ανάστροφης φάσης χρωματογραφία. Οι ηλεκτρολύτες μπορούν να διαχωριστούν με ιοντική, με ανάστροφης φάσης και με ανάστροφης φάσης ζεύγους ιόντων χρωματογραφία. Οι αδιάλυτες στο νερό ενώσεις που διαλύονται όμως στο εξάνιο μπορούν να διαχωριστούν με κανονικής φάσης χρωματογραφία. Οι αμέσως πιο πολικές που διαλύονται στην μεθανόλη μπορεί να διαχωριστούν σε δεμένης φάσης είτε κανονική είτε ανάστροφη χρωματογραφία.

Στο σχήμα 2 φαίνονται όλα τα βήματα που πρέπει να ακολουθούνται για την επιλογή της σωστής χρωματογραφικής μεθόδου.



ΣΧΗΜΑ 2: Στρατηγική για την επιλογή της σωστής χρωματογραφικής μεθόδου

Πάντως, λόγω της υψηλής πολικότητας του νερού η χρωματογραφία ανάστροφης φάσης είναι πιο κατάλληλη από την κανονικής φάσης όταν υπάρχουν ευρύτερης κλίμακας πολικότητας ενώσεις. Οι αλληλεπιδράσεις ένωσης-στατικής φάσης είναι σχετικά μη συγκεκριμένες και ο αριθμός των ομάδων στατικών φάσεων είναι σχετικά περιορισμένος. Ένα άλλο πλεονέκτημα της χρωματογραφίας ανάστροφης φάσης είναι ότι δίνεται η ευκαιρία να προκληθούν ισορροπίες δευτέρας τάξης που βοηθούν ώστε να μπορέσουμε να ρυθμίσουμε την κατακράτηση των ιοντικών ενώσεων. Στην υγρή



χρωματογραφία κανονικής φάσης έχουμε το πλεονέκτημα της μεγάλης ποικιλίας των διαλυτών.

4. Θεωρία της χρωματογραφίας - Σχήμα της κορυφής

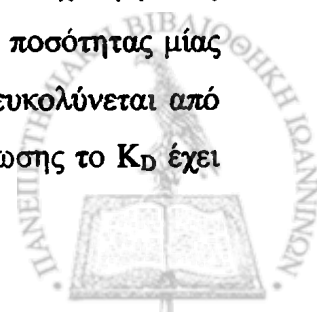
Ο συντελεστής κατανομής K_D είναι σταθερός και ανεξάρτητος από το μέγεθος του δείγματος. Για το λόγο αυτό το διάγραμμα C_s συναρτήσει του C_m θα είναι μια ευθεία γραμμή όπου η κλίση θα δίνει τον συντελεστή K_D . Το διάγραμμα αυτό ονομάζεται ισόθερμη καθώς πραγματοποιείται σε μία θερμοκρασία.

Η κορυφή στο χρωματογράφημα της ένωσης που υπακούει στην γραμμική αυτή σχέση είναι συμμετρική και Gaussian και μπορεί να περιγραφεί από την εξίσωση κανονικής κατανομής.

Συνήθως όμως οι περισσότερες κορυφές στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς δεν είναι συμμετρικές και δίνουν ισόθερμες μη γραμμικές ¹⁶⁶.

Για παράδειγμα, οι ισόθερμες Langmuir παρατηρούνται στα συστήματα προσρόφησης λόγω της ρόφησης σε ετερογενείς θέσεις ενέργειας, που είναι αποτέλεσμα ύπαρξης ελευθέρων SiOH ή όξινων κατά Lewis θέσεων, στην επιφάνεια των πυριτικών υποστρωμάτων. Αυτή η συμπεριφορά συμβαίνει, επειδή οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ένωσης και στατικής φάσης είναι ισχυρές σε αντίθεση με εκείνες μεταξύ ένωσης-ένωσης που είναι σχετικά ασθενείς, όπως συμβαίνει όταν η στατική φάση περιέχει θέσεις που σχηματίζουν δεσμό H με τις διαλυμένες ενώσεις. Ο βαθμός της ρόφησης μειώνεται ακολουθώντας το σχηματισμό μονοστρώματος, ενώ η συγκέντρωση στην κινητή φάση αυξάνεται. Έτσι, ο συντελεστής K_D είναι υψηλός σε χαμηλές τιμές C_s αλλά μειώνεται καθώς η C_m αυξάνεται. Όσο η ποσότητα της ένωσης αυξάνεται, το κλάσμα στην κινητή φάση αυξάνεται και συνεπώς οι περιοχές με την μεγαλύτερη συγκέντρωση (π.χ. στο κέντρο της ζώνης) μεταναστεύουν με μεγαλύτερη ταχύτητα. Τα μόρια της ένωσης στο κέντρο της ζώνης ανταγωνίζονται τα μόρια στην αρχή της ζώνης, παράγοντας μία κορυφή με απότομο ξεκίνημα και τραβηγμένη ουρά.

Οι ισόθερμες τύπου anti-Langmuir είναι πιο διαδεδομένες στα συστήματα κατανομής όπου οι αλληλεπιδράσεις ένωσης-στατικής φάσης είναι ασθενείς σε σχέση με τις ένωσης-ένωσης ή όπου η στήλη υπερφορτώνεται λόγω υπερβολικής ποσότητας μίας ένωσης. Στην περίπτωση αυτή η ρόφηση μιας επιπλέον ένωσης διευκολύνεται από άλλα ήδη ροφημένα μόρια. Έτσι, σε χαμηλές συγκεντρώσεις της ένωσης το K_D έχει



χαμηλή τιμή που αυξάνεται γρήγορα καθώς τα μόρια της ένωσης ελκύουν επιπλέον μόρια στην στατική φάση. Το αποτέλεσμα είναι μία κορυφή με τραβηγμένη αρχή και απότομο τέλος (ουρά).

Ένας άλλος τύπος ισοθερμών προέρχεται λόγω χημειορόφησης των μορίων στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Το αποτέλεσμα είναι μία κορυφή που επιστρέφει πολύ δύσκολα στην γραμμική βάση επειδή η διαδικασία εκρόφησης είναι τόσο αργή, όπως στην χρωματογραφία συμπλόκου. Σε μερικές περιπτώσεις συμβαίνει πλήρης κατακράτηση της ένωσης από την στατική φάση και μη εμφάνιση κορυφής.

Η ασυμμετρία στις κορυφές μπορεί να οφείλεται και σε άλλους παράγοντες. Για παράδειγμα, οι νεκροί όγκοι στις στήλες οφείλονται στο 'μάζεμα' της στατικής φάσης από την συνεχόμενη χρήση της στήλης και έτσι το σήμα είναι προοδευτική διαπλάτυνση της κορυφής. Όταν το κενό βρίσκεται κοντά στην είσοδο της στήλης γίνεται διαπλάτυνση της κορυφής, αλλά τα κενά που καταλαμβάνουν μέρος μόνο της φάσης μπορούν να παράγουν τραβηγμένη ουρά ή αρχή.

5. Μοντέλα κατακράτησης στην χρωματογραφία ανάστροφης φάσης

Ο χρόνος κατακράτησης μιας ένωσης ισούται με το άθροισμα του χρόνου που αυτό βρίσκεται στην κινητή φάση, t_0 και του χρόνου που βρίσκεται στην στατική φάση, t_s , δηλαδή: $t_r = t_0 + t_s$

Η κατακράτηση μιας ένωσης είναι αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων ένωσης-στατικής φάσης, ένωσης-κινητής φάσης και στατικής φάσης-κινητής φάσης. Εάν οι αλληλεπιδράσεις με την στατική φάση είναι σταθερές, τότε η κατακράτηση και η εκλεκτικότητα είναι αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης με την κινητή φάση. Η απλούστερη κινητή φάση αποτελείται από δύο διαλύτες, έναν ασθενή Α και έναν ισχυρό Β.

Δύο μοντέλα έχουν προταθεί για την ερμηνεία της κατακράτησης στην υγρή χρωματογραφία, το μοντέλο διαλύτη-κατανομής ¹⁶⁷ και το μοντέλο διαλύτη-ανταγωνισμού ¹⁶⁸. Και τα δύο θεωρούν την ύπαρξη ενός μονοστρώματος ή πολλαπλών στρωμάτων των ισχυρών μορίων της κινητής φάσης που προσροφούνται στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Στο πρώτο μοντέλο, του διαλύτη-κατανομής η ένωση κατανέμεται μεταξύ της κινητής φάσης και του στρώματος του διαλύτη που έχει προσροφηθεί στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Στο μοντέλο διαλύτη-ανταγωνισμού η ένωση ανταγωνίζεται τα μόρια του διαλύτη για τις ενεργές θέσεις



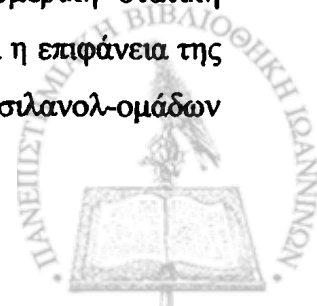
της στατικής φάσης. Και τα δύο μοντέλα είναι ισοδύναμα, γιατί και τα δύο θεωρούν ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης και της στατικής φάσης είναι σταθερές και ότι η κατακράτηση καθορίζεται από την σύσταση της κινητής φάσης. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί ισοεκλουστικές σειρές που χαρακτηρίζουν τους διαλύτες (οργανικούς τροποποιητές) ανάλογα με την συγγενειά τους με τις στατικές φάσεις οι οποίες δεν μπορούν να ξεχωρίσουν τα δύο μοντέλα.

6. Οι επιδράσεις της στατικής φάσης στην χρωματογραφία ανάστροφης φάσης

Η πλειοψηφία των διαχωρισμών γίνεται με στήλες που βασίζονται στην τροποποιημένη πυριτία και η πιο συνήθης στατική φάση είναι το δεκαοκτυλο σιλοξάνιο.

Εκτός από τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις η κατακράτηση των ενώσεων ενισχύεται από συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις ένωσης-στατικής φάσης όπως οι διπόλου-διπόλου στις κυανο-δεμένες φάσεις και οι π-π αλληλεπιδράσεις στις φαινυλο-δεμένες φάσεις.

Η κάλυψη με ανθρακική αλυσίδα της στατικής φάσης εξαρτάται από την σχετική επιφάνεια επικάλυψης και το μήκος της αλυσίδας των δεμένων δραστικών ομάδων. Η συγκέντρωση σε σιλανικές ομάδες της επιφάνειας είναι μεταξύ 7 και 8 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ από τις οποίες τα 3-4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ περίπου αξιοποιούνται λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Συνεπώς, η επικάλυψη με ανθρακική αλυσίδα είναι επίσης συνάρτηση της ειδικής επιφάνειας του πυριτικού υποστρώματος, το οποίο ποικίλλει 100 και 400 m^2/g . Επίσης, η σιλανοποίηση εξαρτάται από την μέθοδο της σύνθεσης. Μία ποικιλία αντιδράσεων έχει αναπτυχθεί για την χημική πρόσδεση των υδρογονανθράκων με την πυριτία. Οι δύο πιο διαδεδομένες χρησιμοποιούν είτε το χλωροδιμεθυλοακυλοσιλάνιο είτε το τριχλωροακυλοσιλάνιο. Το πρώτο εκ των δύο παράγει μία μονομερική ή τύπου 'βούρτσας' στατική φάση. Το μεγαλύτερο ποσοστό κάλυψης σε ανθρακική αλυσίδα που μπορεί να επιτευχθεί με τύπου 'βούρτσας' είναι 15%. Ποσοστά κάλυψης μεγαλύτερα από 20% μπορεί να επιτευχθούν με αντίδραση της σίλικας με τριχλωροακυλοσιλάνιο όπου παράγεται μία πολυμερική στατική φάση. Ο πολυμερισμός αυτός έχει το πλεονέκτημα ότι προστατεύεται η επιφάνεια της πυριτίας από την υδρόλυση. Οι αλληλεπιδράσεις με υπολείμματα σιλανολ-ομάδων



μπορεί να οδηγήσουν σε έναν άλλο μηχανισμό κατακράτησης. Είναι αποτέλεσμα των ηλεκτροστατικών επιδράσεων μεταξύ κατιοντικών ενώσεων και της ιοντισμένης μορφής της σιλανολ-ομάδας ή αποτέλεσμα των δεσμών υδρογόνου με την ουδέτερη μορφή της σιλανολ-ομάδας. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν μόνο στις μονομερικού τύπου στατικές φάσεις¹⁶⁹.

Πρέπει να αποφεύγονται κινητές φάσεις με pH μεγαλύτερο του 7,5 γιατί μπορεί να λάβει χώρα υδρόλυση του σιλοξάνιου με αποτέλεσμα την καταστροφή του πληρωτικού υλικού.

Θεωρητικά, η μεγαλύτερη απόδοση επιτυγχάνεται όταν υπάρχει η μέγιστη διαφορά πολικότητας μεταξύ στατικής και κινητής φάσης. Ευτυχώς οι διαφορετικοί ισοεκλουστικοί συνδυασμοί κινητής φάσης και στατικής φάσης μπορούν να δώσουν διαφορετικές εκλεκτικότητες λόγω του εύρους των αλληλεπιδράσεων ένωσης-εκλουστικού. Οι μεταβολές στην εκλεκτικότητα που συμβαίνουν με την αλλαγή της στατικής φάσης είναι πιο έντονες όταν οι διαφορές στις δομές των ενώσεων σχετίζονται με πολικές δραστικές ομάδες (π.χ. $-OH$, $-C=O$, $-COOH$, $-NR_2$, $-NO_2$, κ.α). Η εκλεκτικότητα ενώσεων που έχουν διαφορετικές μη πολικές υδρόφοβες ομάδες (π.χ. $-CH_3$, $-CH_2-$, $-Cl$, $-Br$, κ.α) είναι πολύ λιγότερο ευαίσθητη σε αλλαγές στην κινητή φάση και την στατική φάση υπό ισοεκλουστικές συνθήκες.

Άλλες στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται είναι τα πολυμερικά υποστρώματα, όπως τα συμπολυμερή πολυστυρόλιου-διβινυλοβενζόλιου. Προέρχονται από το διασταυρωμένο πολυ(διβινυλοβενζυλο)στυρόλιο, που προέρχεται από τον πολυμερισμό μιγμάτων στυρόλιου και διβινυλοβενζόλιου. Οι φάσεις αυτές δίνουν παρόμοιες ή ελαφρά μεγαλύτερες κατακρατήσεις από τις αντίστοιχες στατικές φάσεις των πυριτικών. Είναι πιο χρήσιμες όταν πρόκειται να χρησιμοποιήσουμε κινητή φάση ευρείας κλίμακας pH, επειδή είναι ανθεκτικές στα αλκαλικά διαλύματα. Τα μόνα μειονεκτήματά τους είναι οι μειωμένες αποδόσεις διαχωρισμού καθώς και η μικρή μηχανική αντίστασή τους σε υψηλές πιέσεις.

7. Οι επιδράσεις της κινητής φάσης στην χρωματογραφία ανάστροφης φάσης

Η κύρια δύναμη που ωθεί στον διαχωρισμό τις ενώσεις είναι η υδρόφοβη επίδραση. Έτσι, η κατακράτηση από την στατική φάση συμβαίνει λόγω της απόθησης των μη



πολικών περιοχών του μορίου από τα μόρια του νερού στην κινητή φάση. Αυτές οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ενισχύονται από τις ειδικές αλληλεπιδράσεις ένωσης-διαλύτη στην κινητή φάση και στην στατική φάση. Όπως και στην κανονικής φάσης χρωματογραφία, η κατακράτηση επικεντρώνεται στις αλληλεπιδράσεις με την κινητή φάση, αφού η επιφάνεια της στατικής φάσης κορένεται με μόρια του οργανικού τροποποιητή που προστίθεται στην κινητή φάση. Έτσι, η σύσταση της στατικής φάσης θα παραμείνει σχετικά σταθερή με τις αλλαγές της σύστασης στην κινητή φάση. Ένα μονοστρώμα μεθανόλης θα προσροφηθεί στην επιφάνεια της στατικής φάσης εάν η συγκέντρωση της μεθανόλης στην κινητή φάση είναι μεγαλύτερη από 10%. Για πιο ισχυρούς τροποποιητές όπως είναι το ακετονιτρίλιο ή το τετραυδροφουράνιο, η επιφάνεια της στατικής φάσης θα κορεστεί όταν αυτοί βρίσκονται στην κινητή φάση και σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 10%.

Διάφοροι ερευνητές ^{170,171} έχουν εφαρμόσει κατά καιρούς την διαλυτοφοβική θεωρία ¹⁷² η οποία λαμβάνει υπόψη όλα τα στοιχεία από το μοντέλο ανταγωνισμού διαλύτη και το μοντέλο αλληλεπίδρασης διαλύτη, καθώς και όλες τις πιθανές αλληλεπιδράσεις ενώσεων-κινητής φάσης-στατικής φάσης.

Η κατακράτηση στην χρωματογραφία ανάστροφης φάσης μειώνεται όσο μειώνεται η συγκέντρωση του νερού στην κινητή φάση. Ο λογάριθμος του παράγοντα κατακράτησης *k'* για μία δεδομένη ένωση έχει βρεθεί ¹⁵⁸ ότι σχετίζεται γραμμικά με τον λόγο του όγκου του οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση, σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

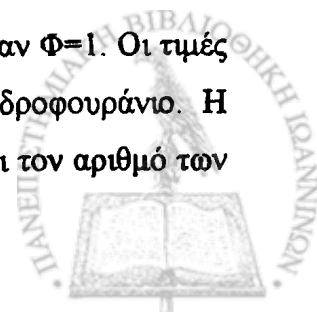
$$\log k' = \log k'_w - S\Phi \quad (1)$$

όπου *k'_w* είναι ο παράγοντας χωρητικότητας της ένωσης σε κινητή φάση αποκλειστικά υδατική (δηλ. $\Phi=0$) και *S* είναι η κλίση.

Η εξίσωση αυτή είναι αρκετά βολική προκειμένου για τον χαρακτηρισμό της ισχύος του εκλουστικού και της πολικότητας της στατικής φάσης. Η κλίση αποτελεί την βάση που δείχνει τον δείκτη της ισχύος του εκλουστικού επειδή σχετίζεται άμεσα με το $\log k'$ με την σχέση:

$$S = \log k'_w - \log k'_s \quad (2)$$

όπου *k'_s* είναι ο παράγων κατακράτησης για μία δεδομένη ένωση όταν $\Phi=1$. Οι τιμές κυμαίνονται από 2,6 για την μεθανόλη έως 4,5 για το τετραυδροφουράνιο. Η απαίτηση όμως να είναι αναμίξιμος με το νερό ο διαλύτης περιορίζει τον αριθμό των



διαλυτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην χρωματογραφία ανάστροφης φάσης. Η λίστα των διαλυτών περιορίζεται ακόμη περισσότερο αν αφαιρέσουμε την αιθανόλη λόγω υψηλού κόστους, την ακετόνη λόγω υψηλής απορρόφησης στο UV, την προπανόλη-2 για το υψηλό ιξώδες, το διοξάνιο που έχει παρόμοια ισχύ με το ακετονιτρίλιο αλλά όμως είναι επικίνδυνο για την υγεία. Έτσι, οι οργανικοί τροποποιητές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά σειρά αυξανόμενης ισχύος είναι μεθανόλη < ακετονιτρίλιο < τετραυδροφουράνιο.

Όπως η τιμή του S χρησιμοποιείται για να καθορίσει την ισχύ του εκλουστικού έτσι και ο $\log k'_w$ χρησιμοποιείται σαν μέτρο της υδροφοβικότητας της ένωσης. Η εξίσωση (1) δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλα τα συστήματα, καθώς υπόκειται σε σφάλματα. Τα σφάλματα αυτά προέρχονται από το γεγονός ότι η εξίσωση κρατάει για μικρές κλίμακες του Φ . Έτσι γίνονται λάθη στην εκτιμούμενη τιμή του $\log k'_w$ εάν κάνουμε μεγάλες προεκτάσεις στο $\Phi=0$. Παρόμοια, θα συμβούν σφάλματα στις σχετικές τιμές του S για διαφορετικούς οργανικούς τροποποιητές εάν αυτοί μετρηθούν σε διαφορετικές κλίμακες του Φ . Για τιμές Φ μεγαλύτερες από 0,3, ο $\log k'$ έχει βρεθεί¹⁷³ ότι σχετίζεται με το Φ σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\log k' = \log k'_w + A\Phi + B\Phi^2 \quad (3)$$

Επειδή η κατακράτηση σχετίζεται κυρίως με την υδροφοβικότητα ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού ($\log P$) έχει προταθεί για την πρόβλεψη της κατακράτησης των ενώσεων. Γενικά υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ του $\log P$ και $\log k'$ για τις ενώσεις που εκλύονται με μίγματα μεθανόλης-νερού σε στατικές φάσεις με υδρογονάνθρακες. Η συσχέτιση έγινε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\log P = C \log k' + D \quad (4)$$

όπου C και D είναι η κλίση και η τεταγμένη επί την αρχή, αντίστοιχα.

Ο παράγων χωρητικότητας k' σχετίζεται με τον συντελεστή κατανομής της ένωσης μεταξύ κινητής και στατικής φάσης και δίνεται από τον τύπο:

$$k' = K_D V_s/V_m \quad (5)$$



8. Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης κινητής φάσης - ένωσης

Όπως συμβαίνει και στην χρωματογραφία κανονικής φάσης, το πρώτο βήμα για την βελτιστοποίηση είναι ο προσδιορισμός της ισχύος του εκλουστικού ώστε να επιτευχθεί τιμή k' μεταξύ 2 και 10 για μία επιλεγμένη στατική φάση. Ένα μίγμα π.χ. μεθανόλης-νερού (50%-50%) είναι αρκετά καλό για αρχή. Οι περισσότεροι τρόποι βελτιστοποίησης περιλαμβάνουν τον καθορισμό των ισοεκλουστικών μιγμάτων μεθανόλης-νερού, ακετονιτρίλιου-νερού και τετραυδροφουράνιου-νερού. Τα δυαδικά συστήματα διαλυτών A, B και C καθορίζουν το πλάνο που μετέπειτα διερευνάται για τον καλύτερο συνδυασμό νερού, μεθανόλης, ακετονιτρίλιου και τετραυδροφουράνιου που απαιτείται για τον διαχωρισμό.

Ο παράγοντας k' επηρεάζεται από τις δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ κινητής φάσης και ενώσεων¹⁷⁴, οι οποίες μπορεί να είναι οι εξής:

Δυνάμεις διασποράς ή London

Συμβαίνουν λόγω της τυχαίας κίνησης των ηλεκτρονίων στο μόριο που ανήκουν. Αυτή η κίνηση καταλήγει να δημιουργεί στιγμιαίες ασύμμετρες διατάξεις όπου ένα μέρος του μορίου αποκτά αρνητικό φορτίο σε σχέση με κάποιο άλλο. Αυτή η στιγμιαία πόλωση ενός μορίου διαλυμένης ένωσης θα επάγει πόλωση στο γειτονικό μόριο διαλύτη. Έτσι αναπτύσσεται μία στιγμιαία ηλεκτροστατική έλξη. Είναι οι μόνες δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ μη πολικών σωματιδίων. Είναι πιο έντονες μεταξύ μορίων που πολούνται εύκολα ή παραμορφώνονται. Ο δείκτης διάθλασης παρέχει ένα μέτρο πολωσιμότητας. Γενικά, περιμένουμε ισχυρές αλληλεπιδράσεις από δυνάμεις διασποράς μεταξύ διαλυμένης ένωσης και διαλύτη όταν τα μόριά τους εμφανίζουν υψηλό δείκτη διάθλασης. Γίνεται φανερό η αλληλεπίδραση αυτή από την έντονη διαλυτότητα των ενώσεων σε διαλύτες υψηλού δείκτη διάθλασης (THF).

Αλληλεπιδράσεις διπόλων

Συμβαίνουν όταν τα μόρια της διαλυμένης ένωσης και του διαλύτη εμφανίζονται μόνιμα με την μορφή διπόλου (μόνιμη ασυμμετρία φορτίου). Τότε, οι αλληλεπιδράσεις αυτές οδηγούν σε ενισχυμένη διαλυτότητα και χαμηλές τιμές του k' .



Δηλεκτρικές αλληλεπιδράσεις

Προκύπτουν από την ηλεκτροστατική έλξη μιας ιοντισμένης διαλυμένης ένωσης και ενός διαλύτη με υψηλό μόνιμο διπολισμό. Γίνονται φανερές από τις υψηλές διαλυτότητες ιοντικών και δυνάμει να ιονισθούν ενώσεων σε πολικούς διαλύτες όπως το νερό και η μεθανόλη.

Σχηματισμός μοριακών συμπλόκων

Το πιο κοινό παράδειγμα τέτοιας σύμπλεξης είναι ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου μεταξύ διαλυμένης ένωσης με ιδιότητα δότη πρωτονίου και διαλύτη με ιδιότητα δέκτη πρωτονίου ή το αντίθετο.

9. Διαλύτες

Στην χρωματογραφία ανάστροφης φάσης όπως και στην κανονικής φάσης, η εκλουστική ισχύς της κινητής φάσης καθορίζεται κυρίως από την πολικότητά της. Μέτρα για την πολικότητα των διαλυτών αποτελούν τα παρακάτω:

Η παράμετρος διαλυτότητα (δ), ορίζεται ως η τετραγωνική ρίζα της ενέργειας εξάτμισης (ΔE) διαιρημένης με τον μοριακό όγκο (V):

$$\delta^2 = \Delta E/V$$

Η παράμετρος αυτή δείχνει ότι το τετραυδροφουράνιο και ο τετραχλωράνθρακας είναι παρόμοιοι σε ισχύ διαλύτες αν και το δεύτερο δεν αναμιγνύεται με το νερό σε αντίθεση με το πρώτο που αναμιγνύεται σε όλες τις αναλογίες. Παρόμοια συμβαίνει με το χλωροφόρμιο και την ακετόνη. Ο λόγος για την αντιπαράθεση είναι ότι η ενέργεια εξάτμισης επηρεάζεται από όλες τις δυνάμεις αλληλεπίδρασης που μπορεί να παίρνει μέρος ο διαλύτης και έτσι η ολική διαλυτότητα μπορεί να διασπασθεί σε επιμέρους τμήματα αντιπροσωπεύοντας τις συνεισφορές από τις δυνάμεις διασποράς, τις διπολικές αλληλεπιδράσεις και τις τάσεις δότη-δέκτη πρωτονίου.

Μία εναλλακτική παράμετρος είναι ο δείκτης πολικότητας P' που έχει προταθεί από τον Snyder¹⁵⁵. Αυτός βασίζεται πάνω σε πειραματικούς προσδιορισμούς της κατακράτησης τριών διαλυτών με αέρια χρωματογραφία σε μία ποικιλία στατικών φάσεων. Οι διαλύτες που επιλέχθηκαν είναι η αιθανόλη (δότης πρωτονίων υψηλού διπόλου), το 1,4-διοξάνιο (δέκτης πρωτονίων ασθενούς διπόλου) και το νιτρομεθάνιο



(δέκτης πρωτονίων υψηλού διπόλου). Εκτός από τον δείκτη P' υπολογίσθηκαν και άλλες τρεις παράμετροι όπως το x_e (παράμετρος δέκτη πρωτονίων), το x_d (παράμετρος δότου πρωτονίων) και το x_n (παράμετρος ισχυρού διπόλου). Ο δείκτης πολικότητας υπολογίζεται από τον τύπο:

$$P' = \log (Kg')_e + \log (Kg')_d + \log (Kg')_n$$

όπου e , d και n αναφέρονται στην αιθανόλη, διοξάνιο και νιτρομεθάνιο αντίστοιχα και Kg' είναι οι συντελεστές κατανομής για κάθε διαλύτη. Τα x_e , x_d και x_n προκύπτουν από τους τύπους:

$$x_e = \log (Kg')_e / P'$$

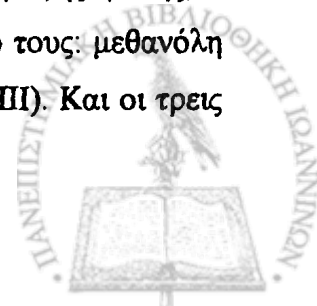
$$x_d = \log (Kg')_d / P'$$

$$x_n = \log (Kg')_n / P'$$

Η σχετική πολικότητα των διαλυτών που υπολογίζεται με τον δείκτη P' είναι διαφορετική από αυτή που υπολογίζεται με την παράμετρο διαλυτότητας δ . Για παράδειγμα, σύμφωνα με την δ η μεθανόλη είναι πιο πολική από το ακετονιτρίλιο, ενώ με τον δείκτη P' το ακετονιτρίλιο είναι πιο πολικό. Από πρακτικές μετρήσεις βέβαια αποδεικνύεται ότι το πρώτο είναι σωστό.

Το βασικό πλεονέκτημα της κατάταξης είναι ότι οι διαλύτες ταξινομούνται σύμφωνα με τον τύπο αλληλεπιδράσεων που παίρνουν μέρος. Διαλύτες που ανήκουν στην ίδια χημική τάξη πέφτουν στην ίδια ομάδα. Αλλά και διαφορετικής χημικής τάξης διαλύτες μπορεί να πέσουν στην ίδια ομάδα, π.χ. το τουλουόλιο και το νιτρομεθάνιο. Σαν διαλύτες της ίδιας ομάδας θα έχουν τις ίδιες ή παρόμοιες τιμές εκλεκτικότητας, εάν ο χρωματογραφικός διαχωρισμός δεν μπορεί να γίνει με ένα συγκεκριμένο μίγμα τότε είναι ανώφελο να αλλάξουμε τον έναν από τους διαλύτες με κάποιον άλλο από την ίδια ομάδα για να πετύχουμε καλύτερο διαχωρισμό. Για παράδειγμα, αλλάζοντας από το μίγμα εξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα (ομάδα VI) σε εξάνιο/ακετονιτρίλιο (ομάδα VI) έχουμε μικρές πιθανότητες βελτίωσης του διαχωρισμού. Μεγαλύτερες πιθανότητες βελτίωσης θα έχουμε με το μίγμα εξάνιο/THF (ομάδα III) ή το μίγμα εξάνιο/προπανόλη (ομάδα II).

Έτσι λοιπόν πρέπει να συνδυάζουμε δύο διαλύτες από διαφορετική ομάδα, έναν με ασθενή ισχύ και έναν με ισχυρή ισχύ. Στην χρωματογραφία ανάστροφης φάσης, ο ασθενής ισχύος διαλύτης είναι το νερό και ο ισχυρής είναι ένας από τους: μεθανόλη (ομάδα II), ακετονιτρίλιο (ομάδα VI) ή τετραυδροφουράνιο (ομάδα III). Και οι τρεις



αυτοί διαλύτες έχουν χαμηλό ιξώδες, χαμηλή απορρόφηση στο UV, δεν είναι τοξικοί και αναμιγνύονται με το νερό.

Κάποια συμπεράσματα για την αλληλεπίδραση των διαλυτών και της στατικής φάσης στην κατακράτηση των ενώσεων δίνονται από τον Valko¹⁷⁵, όπου αναφέρονται τα εξής:

- Η κατακράτηση αυξάνει όσο αυξάνει η υδροφοβικότητα και γενικά το MB των ενώσεων. Έτσι, η σειρά υδροφοβικότητας είναι: υδρογονάνθρακες > καρβοξυλικά οξέα > δικαρβοξυλικά οξέα \approx αλκοόλες. Έχουν παρατηρηθεί βέβαια και εξαιρέσεις, συνήθως με διαλύτη ακετονιτρίλιο, που οφείλονται στην αποτυχία εφαρμογής της εξίσωσης (1) σε συστήματα εκλουστικού υγρού RP-LC που περιλαμβάνουν ακετονιτρίλιο.
- Η κατακράτηση γίνεται μεγαλύτερη για τις ενώσεις εκείνες που είναι δότες πρωτονίων.
- Η κατακράτηση μειώνεται για τις ιοντισμένες ενώσεις, αλλά οι τιμές ιδίως για τις πρωτονιωμένες βάσεις είναι απροσδόκητα χαμηλές. Αυτό οφείλεται όπως έχει ειπωθεί, στον μηχανισμό ιονανταλλαγής των ενώσεων αυτών με τις ιοντισμένες σιλανολ-ομάδες.

Επίσης, όσον αφορά το ενολικό περιεχόμενο των ενώσεων, αυτό μειώνεται όσο αυξάνεται η πολικότητα του διαλύτη. Αυτό συμβαίνει για δύο πιθανούς λόγους: α) η διπολική ροπή της ενόλης (2,00 D) είναι μικρότερη από την διπολική ροπή της κετόνης (14,0 D) λόγω σχηματισμού ενδομοριακού δεσμού H. Έτσι, ένας διαλύτης με υψηλή πολικότητα θα σταθεροποιήσει την κετομορφή λόγω της αλληλεπίδρασης διπόλου-διπόλου, β) ένας πρωτικός διαλύτης μπορεί να σχηματίσει δεσμό H με την κετο μορφή, την οποία και σταθεροποιεί.

10. Κλιμακούμενη έκλυση

Κλιμακούμενη ή βαθμωτή έκλυση (gradient elution) στην χρωματογραφία είναι η τεχνική κατά την οποία αλλάζει η σύσταση της κινητής φάσης κατά την διάρκεια της έκλυσης. Ενώ η πλειοψηφία σχεδόν των διαχωρισμών γίνονται με ισοκρατική έκλυση, δηλαδή με σταθερή σύσταση της κινητής φάσης στην διάρκεια της πορείας της έκλυσης, η βαθμωτή έκλυση χρησιμοποιείται όταν έχουμε ένα μίγμα ενώσεων με διαφορετικούς παράγοντες χωρητικότητας. Ανεξάρτητα από τον τύπο της χρωματογραφίας, η κλιμακούμενη έκλυση ξεκινάει με έναν ασθενούς ισχύος



διαλύτη στον οποίο προστίθεται σταδιακά διαλύτης δυνατής ισχύος. Έτσι, πετυχαίνουμε την βελτιωμένη έκλυση των ενώσεων που έχουν μικρό χρόνο κατακράτησης και για τις ενώσεις που έχουν μεγάλο χρόνο κατακράτησης.

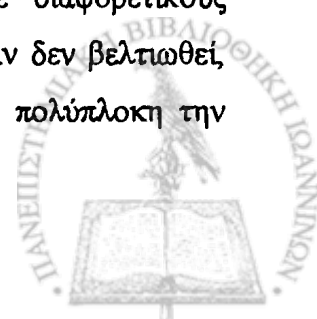
Διαχωρισμοί που έχουν γίνει με κλιμακούμενη έκλυση είναι συνήθως των αμινοξέων, πολυαρωματικών υδρογονανθράκων, καροτενοειδών, φαινολών, τετρακυκλινών, ολιγομερών και πρωτεϊνών. Συνήθως, η κλιμακούμενη έκλυση χρησιμοποιείται στην χρωματογραφία ανάστροφης φάσης, επειδή ο χρόνος για την επίτευξη της ισορροπίας είναι σχετικά σύντομος, οι διαλύτες είναι πιο φθινοί και επειδή ευρύ φάσμα ενώσεων μπορεί να διαχωριστούν. Χρησιμοποιείται επίσης στην ιοντική χρωματογραφία, ενώ δεν συνηθίζεται η βαθμωτή έκλυση στην χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους.

Το προφίλ της κλιμακούμενης έκλυσης μπορεί να είναι γραμμικό όπως συμβαίνει στους περισσότερους διαχωρισμούς, κοίλο όταν οι τελικές συνθήκες εφαρμόζονται γρήγορα, ενώ είναι κυρτό όταν καθυστερούν οι τελικές συνθήκες. Άλλοι προγραμματισμοί μεταβολής των συνθηκών έκλυσης χρησιμοποιούνται για να επηρεάσουν τις βαθμωτές αλλαγές, όπως για να επανέλθουν στις αρχικές συνθήκες.

11. Βελτιστοποίηση της βαθμωτής έκλυσης

Η βελτιστοποίηση της κλιμακούμενης έκλυσης ξεκινάει με την επιλογή δύο διαλυτών διαφορετικής ισχύος, Α και Β. Επίσης, πρέπει οι διαλύτες αυτοί να αναμιγνύονται μεταξύ τους. Στην αρχή κάνουμε ισοκρατική έκλυση με τον διαλύτη Β για να εκλουστούν οι ενώσεις που κατακρατούνται περισσότερο με $k' < 5$. Έπειτα, ισοκρατική έκλυση με τον διαλύτη Α για να εκλουστούν οι ενώσεις που κατακρατούνται λιγότερο. Ακολουθεί η δοκιμή ενός μίγματος των δύο, με πρώτο τον Α, ακολουθώντας γραμμικό προφίλ. Πρέπει να χρησιμοποιηθεί το πιο απότομο προφίλ που επιτρέπει τον επαρκή διαχωρισμό. Όταν ένα δείγμα περιέχει μία σειρά ομολόγων, όπου η κατακράτηση αυξάνεται καθώς αυξάνει το ΜΒ τους, το προφίλ πρέπει να είναι λιγότερο απότομο προς το τέλος του διαχωρισμού από ότι όταν έχουμε ενώσεις με τυχαία ή παρόμοια κατανομή μεγέθους.

Αν η διαδικασία αυτή δεν αποδώσει, μπορούμε να κάνουμε διαφορετικούς συνδυασμούς προφίλ έκλυσης, ή να αλλάξουμε τον διαλύτη Β. Αν δεν βελτιωθεί, τότε προσθέτουμε και τρίτο διαλύτη μολονότι αυτό θα κάνει πιο πολύπλοκη την διαδικασία βελτιστοποίησης.



Μία εναλλακτική λύση είναι να μεταβάλλουμε την ροή στην διάρκεια της έκλουσης. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει χαμηλή ροή στην αρχή και προοδευτική αύξησή της ενώ η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή.

12. Ανιχνευτές

Ο ιδανικός ανιχνευτής για την υγρή χρωματογραφία θα πρέπει να έχει όλες τις ιδιότητες των ανιχνευτών της αέριας χρωματογραφίας. Τα χαρακτηριστικά τα οποία πρέπει να έχει είναι τα εξής:

- Υψηλή ευαισθησία
- Αμελητέο θόρυβο στην γραμμή βάσης (baseline)
- Μεγάλο γραμμικό εύρος
- Να μην αποκρίνεται σε αλλαγές θερμοκρασίας, πίεσης και ρυθμού ροής
- Να έχει ελάχιστο νεκρό όγκο
- Να μην καταστρέφει το δείγμα
- Να είναι σταθερός σε μεγάλες περιόδους χρήσης
- Να είναι εύκολος και αξιόπιστος στον χειρισμό του
- Να είναι οικονομικός
- Να μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τις περιεχόμενες ενώσεις

Οι ανιχνευτές είναι τριών ειδών. Οι γενικοί, οι οποίοι αποκρίνονται σε κάποια ιδιότητα της κινητής φάσης που μεταβάλλεται παρουσία της διαλυμένης ενώσεως. Οι εξειδικευμένοι που αποκρίνονται σε κάποια ιδιότητα της διαλυμένης ενώσεως που δεν έχει η κινητή φάση. Τέλος, υπάρχουν και ανιχνευτές που επιδεικνύουν γενική απόκριση για διαλυμένες ενώσεις μετά από την απομάκρυνση της κινητής φάσης με πτητικοποίηση.

A) Ανιχνευτές απορρόφησης στο UV/Vis.

Είναι εξειδικευμένου τύπου ανιχνευτές και είναι οι πιο διαδεδομένοι στους διαχωρισμούς με υγρή χρωματογραφία. Χωρίζονται σε ανιχνευτές καθορισμένου μήκους κύματος, μεταβαλλόμενου μήκους κύματος, ανιχνευτές σάρωσης και σε πολλαπλών φωτοδίοδων ανιχνευτές. Οι πρώτοι είναι οι πιο απλοί με το μήκος κύματος να καθορίζεται από μία πηγή φωτός. Συνήθως η πηγή αυτή είναι λάμπα Hg που εκπέμπει ακτινοβολία στα 254 nm ή λάμπα Zn με εκπομπή στα 214 nm. Είναι κατάλληλοι για την ανίχνευση αρωματικών ενώσεων. Οι δεύτεροι ανιχνευτές έχουν



την δυνατότητα αλλαγής του μήκους κύματος ώστε να δεχθεί την χαρακτηριστική απορρόφηση μιας ομάδας ενώσεων. Συνήθως χρησιμοποιείται λάμπα δευτερίου για το σκοπό αυτό. Οι ανιχνευτές σάρωσης που είναι υποκατηγορία των ανιχνευτών μεταβαλλόμενου μήκους κύματος, επιτρέπουν την σάρωση ώστε να ληφθεί το φάσμα μίας ένωσης ή να ελεγχθεί εάν δύο ενώσεις έχουν εκλουσθεί ταυτόχρονα. Οι ανιχνευτές πολλαπλών φωτοδιόδων (photodiode array detectors) επιτρέπουν την πολύ ταχύτερη σάρωση από τους προηγούμενους. Το φως που παράγεται από μία λυχνία δευτερίου περνάει από ένα σύστημα αχρωματικών φακών που συγκεντρώνει το πολυχρωματικό φως στην κυψελίδα. Το φως που διαπερνάει πέφτει σε ένα ολογραφικό κάτοπτρο όπου διαθλάται και σκεδάζεται σε μία δίοδο φωτοδιόδων που αποτελείται από εκατοντάδες φωτοδιόδους. Ένα συνηθισμένο PDA αποτελείται από 512 φωτοδιόδους ώστε να δίνει ένα φάσμα από 190-800 nm, οπότε κάθε μία έχει ένα εύρος ζώνης περίπου 2 nm. Η παρουσία βέβαια πολλών φωτοδιόδων αυξάνει την πιθανότητα σφαλμάτων από τυχόν δευτερεύον φθορισμό.

Η καθαρότητα της κορυφής (peak purity parameter) είναι παράμετρος που προτάθηκε από την εταιρία Variant προέρχεται από τα δεδομένα που λαμβάνονται από μία κλίμακα μηκών κύματος ακολουθώντας τον ακόλουθο τύπο:

$$PPP = \frac{A_1^2 x_1 + A_2^2 x_2 + \dots + A_n^2 x_n}{\sum A^2}$$

Όπου x_1, x_2, x_n είναι τα μήκη κύματος που καθορίζονται από τις διόδους και A_1, A_2, A_n είναι οι τιμές της απορρόφησης στα αντίστοιχα μήκη κύματος.

Η εταιρία Shimadzu για να υπολογίσει τον δείκτη καθαρότητας της κορυφής συγκρίνει τα φάσματα που λαμβάνονται από τρία διαφορετικά σημεία της κορυφής, από το ανέβασμα, από το ψηλότερο σημείο και από το κατέβασμα της κορυφής. Η τιμή της παραμέτρου peak purity index δίνεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$PPI = \left(\frac{\sum_{\lambda_i} (a_1(\lambda_i) \times a_2(\lambda_i))}{\sqrt{\sum_{\lambda_i} a_1(\lambda_i)^2} \times \sqrt{\sum_{\lambda_i} a_2(\lambda_i)^2}} + \frac{\sum_{\lambda_i} (a_3(\lambda_i) \times a_2(\lambda_i))}{\sqrt{\sum_{\lambda_i} a_3(\lambda_i)^2} \times \sqrt{\sum_{\lambda_i} a_2(\lambda_i)^2}} \right) \times \frac{1}{2}$$



Η αναλογία απορρόφησης (ratioing absorbance) μπορεί να υπολογιστεί από τα χρωματογραφικά δεδομένα, έχοντας επιλέξει ένα μήκος κύματος σαν μήκος κύματος αναφοράς.

Η κυψελίδα που χρησιμοποιείται στους ανιχνευτές απορρόφησης έχει διάμετρο 1 mm και μήκος περίπου 1 cm, όπως δηλαδή και σε ένα τυπικό φασματοφωτόμετρο. Η γεωμετρία της ποικίλλει αλλά συνήθως έχει σχήμα Z. Οι περισσότερες κυψελίδες περιορίζονται σε πιέσεις όχι μεγαλύτερες από 600 psi.

Β) Ανιχνευτές φθορισμού

Είναι εξειδικευμένου τύπου, έχουν πολύ μεγάλη ευαισθησία. Θα έπρεπε να είναι πρώτοι στην προτίμηση αλλά αυτό δεν συμβαίνει δυστυχώς, αφού 1 στις 40000 ενώσεις φθορίζει σημαντικά. Χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό των πολυκυρηνικών αρωματικών υδρογονανθράκων.

Γ) Ανιχνευτές δείκτη διάθλασης

Είναι γενικού τύπου και βασίζονται στην διαφορά του δείκτη διάθλασης της κινητής φάσης με την κινητή φάση που περιέχει την ένωση. Έχουν το μειονέκτημα ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν με βαθμωτή έκλυση των ενώσεων.

Δ) Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές

Είναι εξειδικευμένου τύπου και χωρίζονται σε αμπερομετρικούς και κουλομετρικούς. Είναι υψηλής ευαισθησίας και εκλεκτικοί. Το μειονέκτημα των αμπερομετρικών είναι ότι χρειάζονται συχνή βαθμονόμηση καθώς τα ηλεκτρόδια 'δηλητηριάζονται'.

Ε) Ανιχνευτές φασματοσκοπίας μάζας

Τα προβλήματα που υπάρχουν είναι δύο και ονομαστικά η σύζευξη και η ευαισθησία του ανιχνευτή. Τρόποι αντιμετώπισης της ζεύξης είναι με μία συσκευή που σχίζει το έκλυσμα σε ένα πολύ μικρό κλάσμα και αυτό εισάγεται στον ανιχνευτή. Ο δεύτερος τρόπος είναι με πτητικοποίηση του διαλύτη πάνω σε έναν κινητό μάντα ή σύρμα και εισαγωγή της παραμένουσας ποσότητας στην περιοχή της πηγής ιόντων του φασματομέτρου μάζας. Ένας άλλος τρόπος για την αντιμετώπιση της ζεύξης που έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια είναι ο θερμοεκνεφωτής.



Β. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ

Θεωρία

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών από τα μικρότερα μόρια βάσει του μεγέθους των περιγράφηκε πρώτα από τον Porath ¹⁷⁶ και ονομάστηκε η διαδικασία αυτή διήθηση μέσω πηκτής (gel filtration). Το υλικό της στήλης, δηλαδή η πηκτή, ήταν δεξτράνη συνδυασμένη με επιχλωρυδρίνη, υλικό που παρασκευάστηκε πρώτα από την εταιρία Pharmacia με το εμπορικό όνομα Sephadex. Κάποιοι ερευνητές ¹⁷⁷ κατόπιν εφάρμοσαν την τεχνική αυτή για τον διαχωρισμό πολυμερών χρησιμοποιώντας οργανικούς διαλύτες, ονομάζοντας έτσι την τεχνική χρωματογραφία διαπερατότητας πηκτής. Αν και οι δύο όροι σήμαιναν υδατικά και οργανικά εκλουστικά, αντίστοιχα, και οι δύο όροι χρησιμοποιούνται από τους κατασκευαστές για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών και πεπτιδίων. Επιπλέον, όροι όπως μοριακός ηθμός, στερητικός αποκλεισμός και χρωματογραφία πηκτής έχουν χρησιμοποιηθεί οδηγώντας ίσως σε κάποια σύγχυση. Ο όρος χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (size exclusion chromatography) είναι πιο περιγραφικός της αρχής που περιγράφει και έχει αρχίσει και αντικαθιστά τους υπόλοιπους όρους.

Ένας μικρός όγκος δείγματος εφαρμόζεται σε μία στήλη που είναι πακεταρισμένη με υλικό που οι πόροι του είναι συγκρίσιμοι με τα μεγέθη των ενώσεων που διαχωρίζονται. Η κινητή φάση που περνάει έπειτα παρασύρει τις ενώσεις αυτές. Το μοριακό μέγεθος των ενώσεων καθορίζει το βαθμό που αυτά θα εισχωρήσουν στους πόρους. Ενώσεις που δεν περνάνε καθόλου μέσα από τους πόρους αποκλείονται αμέσως από την στήλη, στον νεκρό όγκο V_0 . Ο V_0 αντιπροσωπεύει τον όγκο που δεν καταλαμβάνεται από το υλικό της στήλης και προσδιορίζεται με χρωματογραφία μεγάλων μορίων (συνήθως, ο όγκος V_0 είναι το 1/3 του όγκου της κλίνης, V_{bed}). Ενώσεις που εισέρχονται από τους πόρους ελεύθερα έχουν πλήρη πρόσβαση στον εσωτερικό όγκο των πόρων, V_i . Τέτοιες ενώσεις που εκλύονται στον V_i , συνολικό όγκο που καταλαμβάνει στην στήλη η κινητή φάση, και αντιστοιχεί στον όγκο έκλυσης ενώσεων αρκετά μικρού μοριακού βάρους είναι ενώσεις που είναι αρκετά



μικρές ώστε να κατανεμηθούν ελεύθερα μεταξύ εσωτερικού και εξωτερικού όγκου των πόρων. Έτσι, ισχύει:

$$V_i = V_o + V_i$$

Ένα μόριο που εισχωρεί στους πόρους εκλούεται με όγκο V_e μεταξύ των δύο άκρων V_o και V_i . Ο συντελεστής κατανομής, K_d , για τέτοια μόρια αντιπροσωπεύει το κλάσμα του πορώδους του τεμαχιδίου της στήλης που είναι διαθέσιμο για την διάχυση. Έτσι, $V_e = V_o + K_d V_i$ και από την σχέση αυτή προκύπτει:

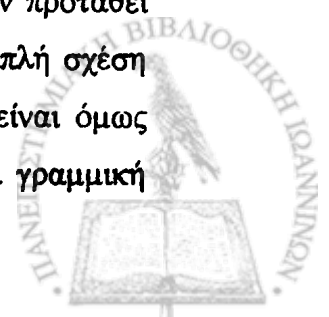
$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i}$$

Όπου V_i προσδιορίζεται από την σχέση $V_i = V_t - V_o$ και έτσι

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Μία από τις βασικές εφαρμογές της SEC είναι η εκτίμηση των μοριακών βαρών πολυμερών από τις τιμές των K_d , που λαμβάνονται συνήθως βάσει του διαγράμματος K_d σε σχέση με το $\log MB$. Αφού το K_d είναι ανάλογο με το V_e , χρησιμοποιούνται συνήθως διαγράμματα του V_e σε συνάρτηση με το $\log MB$, αν και υπάρχει το μειονέκτημα ότι τα V_e εξαρτώνται από τις διαστάσεις της στήλης. Έχουν γίνει προσπάθειες για τον καθορισμό μιας καθολικής παραμέτρου βαθμονόμησης που να ισχύει με βάση το K_d για όλα τα πολυμερή. Εφόσον η βάση για τον διαχωρισμό στην SEC είναι το μέγεθος, θα πρέπει να περιμένει κανείς την παράμετρο αυτή να περιγράψει τις διαστάσεις ενός μορίου. Ως τέτοιες παράμετροι έχουν προταθεί η ακτίνα Stokes, η ακτίνα gyration ή η ακτίνα ιξώδους. Η ακτίνα ιξώδους αντιπροσωπεύει τον υδροδυναμικό όγκο σαν λειτουργία του ιξώδους επί το μοριακό βάρος και έχει βρεθεί ότι δείχνει ελάχιστη απόκλιση από την γραμμικότητα¹⁷⁸, αν και δεν είναι κατάλληλη παράμετρος για την σύγκριση των μεγαλομορίων που έχουν μορφή ράβδου με τα μόρια άλλης μορφής¹⁷⁹.

Στην περίπτωση διαλυτών πρωτεϊνών, τα περισσότερα μοντέλα που έχουν προταθεί θεωρούν το σχήμα των πρωτεϊνών αυτών σφαιρικό, εξάγοντας έτσι μία απλή σχέση μεταξύ του μεγέθους και του μοριακού βάρους. Τα μοντέλα αυτά δεν είναι όμως αποτελεσματικά και για τα πεπτίδια. Μοντέλα που δείχνουν ότι υπάρχει γραμμική



σχέση μεταξύ της ακτίνας ή του MB της ένωσης και μίας από τις παραμέτρους SEC είναι τα ακόλουθα:

Το μοντέλο ¹⁸⁰ $F'_v = f(M^{1/3})$ όπου $F'(v) = (V_e^{1/3} - V_o^{1/3}) / (V_i^{1/3} - V_o^{1/3})$

Τα μοντέλα ¹⁸¹ $K_d^{1/3} = f(M^{0,555})$, $K_d = f(R)$, $K_d = f(\log M)$

όπου M είναι το μοριακό βάρος της ένωσης και R η ακτίνα ιξώδους.

Η μέτρηση του V_i δεν μπορεί να θεωρηθεί ασήμαντη, γιατί πολλά μικρά μόρια μπορεί να έχουν ιονικές ή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με το υλικό της στήλης. Επιπλέον, στις περιπτώσεις υποστρωμάτων που έχουν πολύ μικρό μέγεθος πόρων, τα φαινόμενα αποκλεισμού μπορεί να συμβαίνουν και για πολύ μικρού MB ενώσεις (περίπου της τάξης των εκατοντάδων), περιορίζοντας έτσι την πιθανότητα εύρεσης κατάλληλων ενώσεων σήμανσης. Μία αρκετά αξιόπιστη ένωση σήμανσης έχει βρεθεί ότι είναι το D₂O, οξείδιο του δευτερίου. Η ένωση αυτή απαιτεί όμως ανιχνευτή δείκτη διάθλασης ¹⁸².

Σε μερικές περιπτώσεις είναι πιο εύκολο να χρησιμοποιούμε τον ολικό εσωτερικό όγκο της κλίνης, V_e . Αυτός ισούται με το άθροισμα του V_i και του όγκου του στερεού υποστρώματος, V_s . Σε (ml) μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο $\pi^2 h$ όπου r είναι η ακτίνα της στήλης και h το ύψος της, και τα δύο εκφρασμένα σε cm. Έτσι, η παράμετρος K_{av} αντί της K_d δίνει τον τύπο:

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o}$$

Ο λόγος K_{av} / K_d είναι σταθερός για μία δεδομένη στήλη ¹⁸³.



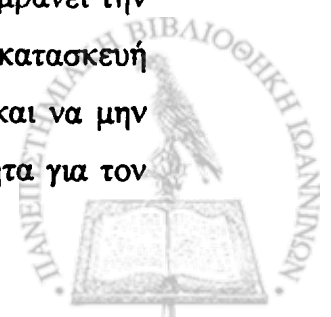
Γ. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΜΕ MEMBRANES

1. Θεωρία

Οι διαχωρισμοί με μεμβράνες γίνονται με σχετική μεταφορά των μορίων διαμέσου ενός φιλμ ή άλλου τοιχίου (μεμβράνης) ¹⁸⁴. Το φιλμ είναι συνήθως στερεό αλλά σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να είναι και υγρό. Η μεμβράνη είναι συνήθως ένα ομοιογενές υλικό ή ένα πιο σύνθετο υλικό με ένα επιδερμικό δραστικό στρώμα που υποστηρίζεται από ένα ισχυρότερο αλλά περισσότερο πορώδες υλικό. Οι τεχνικές διαχωρισμού με μεμβράνες είναι εκείνες που διαχωρίζουν τα μικρού ή μεσαίου μεγέθους σωματίδια, ενώ οι τεχνικές διήθησης χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό των αδιάλυτων σωματιδίων. Δεν υπάρχει σαφής διάκριση μεταξύ διήθησης και διαχωρισμού μέσω μεμβράνης, γιατί μεγάλα μόρια όπως είναι οι πρωτεΐνες και τα πολυμερή θεωρούνται αρκετά μεγάλα ώστε να 'διηθηθούν'.

Οι τεχνικές διαχωρισμού με μεμβράνες μπορεί να πραγματοποιούνται λόγω τριών βασικών κινητήριων δυνάμεων: την διαφορά πίεσεως, την διαφορά συγκέντρωσης και/ή την διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού. Οι δύο πρώτες έχουν μεγαλύτερη εφαρμογή τα τελευταία χρόνια και περισσότερη προοπτική για βελτίωση κατά την εφαρμογή τους στα περιβαλλοντικά ζητήματα. Στον πίνακα 1 περιγράφονται οι τεχνικές διαχωρισμού μέσω μεμβρανών ¹⁶⁶. Οι διαχωρισμοί με μεμβράνες μέσω πίεσης των μικρότερων μορίων από υγρούς διαλύτες, διαχωρισμοί που βασίζονται σε μοριακές ιδιότητες καλούνται ανάστροφη ώσμωση, ενώ ο διαχωρισμός μεγαλύτερων μορίων ονομάζεται υπερδιήθηση, γιατί τα μόρια αυτά συμπεριφέρονται περισσότερο σαν σωματίδια. Η ανάστροφη ώσμωση εξαρτάται περισσότερο από τα χημικά χαρακτηριστικά των μορίων παρά αποκλειστικά από το μέγεθος των. Η βασική διαφορά μεταξύ των κινητήριων δυνάμεων πίεσης και συγκέντρωσης βρίσκεται στον διαχωρισμό υγρών συστημάτων.

Η επιλογή και ο σχεδιασμός για τον διαχωρισμό μέσω μεμβράνης περιλαμβάνει την εύρεση του κατάλληλου υλικού καθώς και τα κατάλληλα υλικά για την κατασκευή του εξοπλισμού. Η μεμβράνη πρέπει να είναι συμβατή με όλα τα υγρά και να μην αποσυντίθεται γρήγορα από τη χρήση. Πρέπει να έχει υψηλή εκλεκτικότητα για τον



διαχωρισμό και υψηλό βαθμό διαπερατότητας. Ένα πρόβλημα που μπορεί να συμβεί είναι το βούλωμα, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της διαπερατότητας ή της εκλεκτικότητας της μεμβράνης από την συνεχόμενη χρήση ή έκθεσή της στο υγρό.

Ο διαχωρισμός μέσω μεμβράνης μπορεί να γίνει και σταδιακά και όχι με το πρώτο κίβλας πέρασμα ή με λίγα περάσματα από την μεμβράνη. Πάντως, το πέρασμα από πολλές μεμβράνες δεν είναι τόσο απλό όπως ο σταδιακός διαχωρισμός με άλλες τεχνικές όπως η προσρόφηση, η εκχύλιση ή η απόσταξη. Έτσι, είναι προτιμότερο να πραγματοποιείται ο διαχωρισμός με ένα ή λίγα περάσματα από την μεμβράνη.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Τεχνικές διαχωρισμού με μεμβράνες

Τεχνική διαχωρισμού	Τύπος μεμβράνης (διάμετρος πόρων, μm)	Κινητήριος δύναμη	Μέθοδος διαχωρισμού	Εφαρμογές
Μικροδιήθηση	Συμμετρικός, με μικροπόρους (10-0,1 μm)	Διαφορά υδροστατικής πίεσεως, 0,01-0,1 MPa	Μηχανισμός διήθησης, μαζί με προσρόφηση	Καθαρισμός, διήθηση αποστείρωσης
Υπερδιήθηση	Ασύμμετρος, με μικροπόρους (1-0,001 μm)	Διαφορά υδροστατικής πίεσεως, 0,05-0,5 MPa	Μηχανισμός διήθησης	Διαχωρισμός των μεγαλομορίων
Διαπίδυση	Με μικροπόρους (0,0001-0,01 μm)	Διαφορά στην συγκέντρωση	Μηχανισμός διάχυσης	Διαχωρισμός αλάτων και άλλων ενώσεων από μεγαλομόρια
Ανάστροφη ώσμωση	Ασύμμετρος	Διαφορά υδροστατικής πίεσεως, 2-10 MPa	Μηχανισμός διάχυσης	Διαχωρισμός αλάτων και άλλων ενώσεων από μεγαλομόρια

2. Διαπίδυση

Διαπίδυση είναι η μετακίνηση σωματιδίων από διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης μέσω μίας ημιπερατής μεμβράνης¹⁸⁵. Τα σωματίδια που μετακινούνται είναι αυτά μόνο που έχουν μικρότερο μέγεθος από τους πόρους της μεμβράνης. Έτσι, με τον τρόπο αυτό σωματίδια όπως είναι π.χ. τα κολλοειδή διαχωρίζονται από μικρότερα μόρια επειδή δεν μπορούν να περάσουν από τους πόρους μιας μεμβράνης διαπίδυσης. Τα κανονικά μεγέθη πόρων των μεμβρανών κυμαίνονται από 1-5 nm αναλογώντας σε αποκλεισμό μοριακών βαρών 1000-10000 Daltons. Στο δείγμα δεν εφαρμόζεται καμία πίεση, τα ημιπερατά μόρια διαχέονται διαμέσου της μεμβράνης από το δείγμα προς την έξω πλευρά της μεμβράνης που περιέχει υγρό. Στην ισορροπία, η συγκέντρωση π.χ. του μορίου που διαχέεται στο εξωτερικό διάλυμα (dialyzate) είναι η ίδια με την συγκέντρωσή του στο δείγμα (dialyzable). Για παράδειγμα, εάν 1 ml ενός δείγματος εισαχθεί σε μία μεμβράνη διαπίδυσης έναντι 200 ml ρυθμιστικού διαλύματος, η συγκέντρωση των ενώσεων του δείγματος που μπορούν να περάσουν την μεμβράνη θα αραιωθεί κατά 200 φορές περίπου. Με καινούρια αλλαγή του εξωτερικού ρυθμιστικού διαλύματος θα αραιωθεί ακόμη 200 φορές. Για παράδειγμα, με τρεις αλλαγές του εξωτερικού ρυθμιστικού διαλύματος, θα έχουμε πετύχει αραιώση των ενώσεων του δείγματος που περνούν την μεμβράνη κατά $200 \times 200 \times 200$ ή 8.000.000 φορές.

Πάντως, πρακτικά υπάρχει ένας αριθμός πολύπλοκων παραγόντων που πρέπει να ληφθεί υπόψιν.

1. Όταν ένα δείγμα εισάγεται σε μία μεμβράνη διαπίδυσης, ο όγκος του υγρού απ' έξω πρέπει να είναι μικρός συγκρινόμενος με τον όγκο του δείγματος στη μεμβράνη, ώστε να αποφευχθεί η διατάραξη της ισορροπίας και μία μη αντιπροσωπευτική συγκέντρωση του είδους στο έξω διάλυμα σε σχέση με το αρχικό δείγμα.
2. Μπορεί να σημειωθεί απώλεια λόγω προσρόφησης στη μεμβράνη, η οποία είναι συνήθως φορτισμένη αρνητικά. Πάντως, δεν έχουν σημειωθεί αξιόλογα προβλήματα από το φαινόμενο αυτό.
3. Επειδή οι μεμβράνες διαπίδυσης όπως ειπώθηκε πριν είναι συνήθως φορτισμένες αρνητικά, τα αρνητικά φορτισμένα μόρια θα τείνουν να απωθούνται και να χρειάζονται έτσι μεγάλο χρονικό διάστημα για να πετύχει η ισορροπία.



4. Οι επιδράσεις Donnan μπορεί να οδηγήσουν την συγκέντρωση του ενδιαφερόμενου είδους στο έξω διάλυμα να είναι μικρότερη από την συγκέντρωσή του στο δείγμα, εάν υπάρχουν στο δείγμα και ανιόντα που δεν μπορούν να υποστούν διαπίδυση¹⁸⁶. Στην περίπτωση αυτή μπορεί να γίνει διόρθωση.

3. Θεωρία της ισορροπίας στην διαπίδυση

Πολλές φορές χρησιμοποιείται η ισορροπία μεμβράνης για την μέτρηση της σύνδεσης μικρών μορίων ή ιόντων με ένα μεγαλομόριο. Η αρχή αυτή περιγράφεται ως ακολούθως¹⁸⁷:

Το διάλυμα που περιέχει τα μεγαλομόρια τοποθετείται μέσα στην μεμβράνη (φάση α) και αιωρείται σε ένα διάλυμα το οποίο περιέχει τα μικρά μόρια (φάση β). Στο σχήμα 1 φαίνεται η τεχνική της διαπίδυσης. Στην ισορροπία, η όποια περίσσεια συγκέντρωσης από τις χαμηλού MB ενώσεις στην πλευρά των μεγάλου MB ενώσεων θεωρείται σαν σύνδεση μεταξύ των. Ονομάζοντας την ένωση με το χαμηλό MB (την οποία θεωρούμε ότι δεν είναι ηλεκτρολύτης) ως συστατικό 2, έχουμε την ισορροπία:

$$\mu_2^{\alpha} = \mu_2^{\beta} \quad (1)$$

Αν αγνοήσουμε την μικρή διαφορά στο χημικό δυναμικό που υπάρχει λόγω της διαφοράς πίεσης μεταξύ των δύο πλευρών, έχουμε:

$$RT \ln C_2^{\alpha} y_2^{\alpha} = RT \ln C_2^{\beta} y_2^{\beta} \quad (2)$$

$$C_2^{\alpha} y_2^{\alpha} = C_2^{\beta} y_2^{\beta} \quad (3)$$

Σημειωτέον, ότι δεν έχουμε κάνει κάποια διάκριση μεταξύ δεσμευμένου και μη δεσμευμένου συστατικού 2 στην πλευρά α. Εάν υποθέσουμε ότι υπάρχει στην πλευρά α, και το ένα και το άλλο, και ότι τα περιβάλλοντα είναι παρόμοια ούτως ώστε ο συντελεστής ενεργότητας για το συστατικό 2 να είναι ο ίδιος και για τις δύο πλευρές, τότε έχουμε:

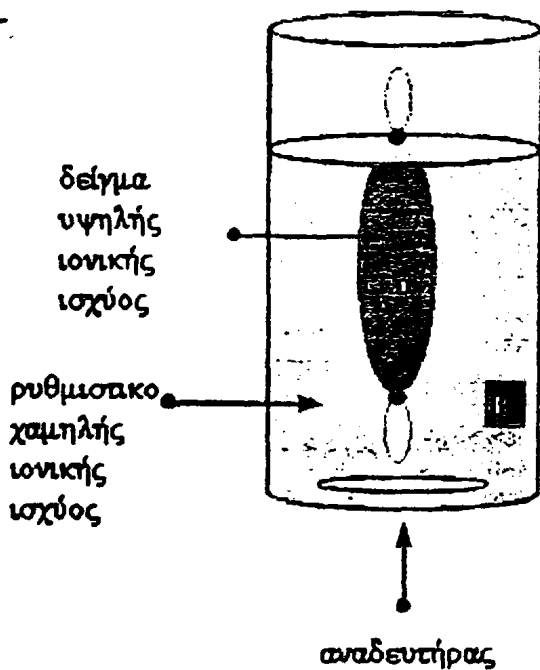


$$C_2^a \text{ (μη δεσμευμένο)} = C_2^b \quad (4)$$

και συνεπώς,

$$C_2^a \text{ (δεσμευμένο)} = C_2^a - C_2^b \quad (5)$$

Για την επίτευξη του αποτελέσματος αυτού, έχουν γίνει κάποιες αυθαίρετες υποθέσεις. Εάν υποθέσουμε ότι ένα μεγαλομόριο δεν δεσμεύει καθόλου το μόριο που μας ενδιαφέρει, αλλά ότι το αποκλείει τελείως από τον όγκο που κατέχει, θα ισχύει $C_2^a < C_2^b$ και αυτό ερμηνεύεται ως αρνητική δέσμευση. Είναι φανερό, ότι εκτός και αν η δέσμευση είναι ισχυρή, οι αναλύσεις πρέπει να αντιμετωπίζονται προσεκτικά.

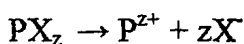


ΣΧΗΜΑ 3: Ισορροπία κατά την διαχύση

4. Θεωρία της ισορροπίας Donnan

Μέχρι στιγμής θεωρήσαμε ότι οι ενώσεις που διαχέονται μέσω μιας μεμβράνης διαπίδυσης δεν φέρουν κάποιο φορτίο. Εάν δεν συμβαίνει αυτό και έχουμε μεγαλομόρια που είναι πολυηλεκτρολύτες, τότε η κατάσταση γίνεται πιο πολύπλοκη. Επειδή τα βιοπολυμερή στην πλειοψηφία τους φέρουν φορτίο, δεν μπορούμε να μην λάβουμε υπόψη τον παράγοντα αυτόν. Έτσι, χρησιμοποιούμε την ισορροπία Donnan για να προσδιορίσουμε το μοριακό βάρος πολυηλεκτρολυτών, μόνο όταν αυτοί βρίσκονται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ηλεκτρολύτη¹⁸⁷. Σε χαμηλή συγκέντρωση ηλεκτρολύτη, η ωσμωτική πίεση καθορίζεται κατά κύριο λόγο από τα μονοσθενή ιόντα.

Θεωρούμε την ύπαρξη μόνο ενός πολυηλεκτρολύτη PX_z σε ένα διάλυμα ο οποίος δίσταται ως ακολούθως:



όπου X^- είναι το μονοσθενές ανιόν.

Εφόσον τα μοναδικά ιόντα που υπάρχουν στο διάλυμα είναι το πολυκατιόν P^{z+} και τα αντισταθμιστικά ιόντα X^- , τότε το αποτέλεσμα είναι ασήμαντο. Επειδή τα αντισταθμιστικά ιόντα πρέπει να παραμείνουν από την πλευρά της μεμβράνης που παραμένει το πολυμερές (για την διατήρηση της ηλεκτρικής ουδετερότητας), θα έχουμε απλά $z+1$ σωματίδια παρόντα για κάθε μόριο της ένωσης. Τότε, όπως όλες οι προσθετικές ιδιότητες, έτσι και η ωσμωτική πίεση, πρέπει να αυξηθεί κατά έναν παράγοντα $z+1$ και το υλικό θα συμπεριφέρεται σαν να έχει μοριακό βάρος $1 / z+1$ φορές το μοριακό βάρος του αδιάστατου πολυμερούς. Εάν ο σκοπός μας είναι να βρούμε το MB του πολυκατιόντος, θα έχουμε υποπέσει σε σφάλμα, γιατί θα έχουμε μετρήσει το μέσο MB του μίγματος κατιόντος και αντισταθμιστικών ιόντων. Ευτυχώς αυτή η κατάσταση σπάνια προσεγγίζεται, αφού τις περισσότερες φορές οι πολυηλεκτρολύτες μελετώνται παρουσία άλλων ηλεκτρολυτών μικρού MB.

Για παράδειγμα, θεωρούμε ένα διάλυμα που εκτός από τον πολυηλεκτρολύτη PX_z έχουμε προσθέσει και έναν ηλεκτρολύτη BX ($BX \rightarrow B^+ + X^-$) με μικρό MB. Η μεμβράνη είναι ημιπερατή από τα B^+ , X^- και το νερό και αδιαπέραστη από το P^{z+} .

Τότε, θα έχουμε:



$$\mu^{\alpha}_{\text{BX}} = \mu^{\beta}_{\text{BX}}$$

Το χημικό δυναμικό του άλατος μπορεί να γραφτεί ως $\mu_{\text{BX}} = \mu^0_{\text{BX}} + RT \ln[B^+][X^-]$, όπου $[B^+]$ και $[X^-]$ είναι οι γραμμομοριακές συγκεντρώσεις των Β και Χ, αντίστοιχα. Θεωρώντας αμελητέα την διαφορά $\mu^{\alpha}_{\text{BX}} - \mu^{\beta}_{\text{BX}}$, προκύπτει η εξίσωση:

$$[B^+]^{\alpha} [X^-]^{\alpha} = [B^+]^{\beta} [X^-]^{\beta} \quad (6)$$

Μία δεύτερη εξίσωση που προκύπτει από την ηλεκτρική ουδετερότητα είναι ότι το σύνολο θετικών φορτίων είναι ίσο με το σύνολο αρνητικών φορτίων για κάθε μία από τις πλευρές της μεμβράνης. Έτσι ισχύει:

$$\text{Για την πλευρά } \alpha: z[P^{z+}]^{\alpha} + [B^+]^{\alpha} = [X^-]^{\alpha} \quad (7)$$

$$\text{Για την πλευρά } \beta: [B^+]^{\beta} = [X^-]^{\beta} \quad (8)$$

Συνδυάζοντας τις εξισώσεις (6), (7) και (8) προκύπτει:

$([B^+]^{\beta})^2 = ([B^+]^{\alpha})^2 [1 + (z[P^{z+}]^{\alpha} / [B^+]^{\alpha})]$ (9) $\Rightarrow ([B^+]^{\beta})^2 = ([B^+]^{\alpha})^2 + z[P^{z+}]^{\alpha} [B^+]^{\alpha} \Rightarrow ([B^+]^{\beta})^2 - ([B^+]^{\alpha})^2 = z[P^{z+}]^{\alpha} [B^+]^{\alpha} \Rightarrow ([B^+]^{\beta} - [B^+]^{\alpha}) ([B^+]^{\beta} + [B^+]^{\alpha}) = z[P^{z+}]^{\alpha} [B^+]^{\alpha}$. Αν το $z = 1$, η συγκέντρωση του πολυηλεκτρολύτη είναι $y M$ και η συνολική συγκέντρωση των Χ είναι $x M$, τότε με αντικατάσταση προκύπτει:

$$([B^+]^{\beta} - [B^+]^{\alpha}) x = [P^{z+}]^{\alpha} [B^+]^{\alpha} \Rightarrow x[B^+]^{\beta} - x[B^+]^{\alpha} = y [B^+]^{\alpha} \Rightarrow x[B^+]^{\beta} = (x+y) [B^+]^{\alpha} \Rightarrow [B^+]^{\beta} / [B^+]^{\alpha} = (x+y) / y \quad (10)$$

Για το ανιόν Χ έχουμε:

$([X^-]^{\beta})^2 = ([X^-]^{\alpha})^2 [1 - (z[P^{z+}]^{\alpha} / [X^-]^{\alpha})]$ (11) $\Rightarrow ([X^-]^{\beta})^2 = ([X^-]^{\alpha})^2 - z[P^{z+}]^{\alpha} [X^-]^{\alpha} \Rightarrow ([X^-]^{\beta})^2 - ([X^-]^{\alpha})^2 = -z[P^{z+}]^{\alpha} [X^-]^{\alpha} \Rightarrow ([X^-]^{\beta} - [X^-]^{\alpha}) ([X^-]^{\beta} + [X^-]^{\alpha}) = -z[P^{z+}]^{\alpha} [X^-]^{\alpha}$. Αν το $z = 1$, η συγκέντρωση του πολυηλεκτρολύτη είναι $y M$ και η συγκέντρωση των Χ είναι $x M$, τότε με αντικατάσταση προκύπτει:

$$([X^-]^{\beta} - [X^-]^{\alpha}) x = -[P^{z+}]^{\alpha} [X^-]^{\alpha} \Rightarrow ([X^-]^{\beta} - [X^-]^{\alpha}) x = -y [X^-]^{\alpha} \Rightarrow x [X^-]^{\beta} - x [X^-]^{\alpha} = -y [X^-]^{\alpha} \Rightarrow K [X^-]^{\beta} = (K-y) [X^-]^{\alpha} \Rightarrow [X^-]^{\beta} / [X^-]^{\alpha} = (K-y) / x \quad (12)$$

Τα αποτελέσματα από τις εξισώσεις (9) και (11) μας δείχνουν ότι το ιόν B^+ είναι πιο συμπυκνωμένο στην φάση β από ότι στην α, ενώ για το ιόν Χ ισχύει το αντίθετο



αφού αυτό είναι και αντισταθμιστικό ιόν του P^{z+} . Αυτή η διαφορά συγκέντρωσης είναι η αιτία που οδηγεί στην ώσμωτική πίεση.

Αν συνεχίσουμε τις εξισώσεις (9) και (11), παίρνουμε τις εξισώσεις (10) και (12) αντίστοιχα.

Αν στο διάλυμα έχουμε ως αντισταθμιστικό ιόν το κατιόν, δηλαδή ο πολυηλεκτρολύτης είναι της μορφής $P^{z+}B^+$ και ο ηλεκτρολύτης είναι της μορφής BX ($BX \rightarrow B^+ + X^-$) με μικρό MB , τότε θα προκύψει ότι το ιόν B^+ είναι πιο συμπυκνωμένο στην φάση α από ότι στην β, ενώ για το ιόν X^- θα ισχύει το αντίθετο.

Οι τύποι που ισχύουν, θα έχουν ως εξής:

$$([B^+]^b)^2 = ([B^+]^a)^2 [1 - (z[P^{z+}]^a / [B^+]^a)]$$

και για το ανιόν

$$([X^-]^b)^2 = ([X^-]^a)^2 [1 + (z[P^{z+}]^a / [X^-]^a)]$$

Στο παρακάτω σχήμα βλέπουμε ένα παράδειγμα που πετυχαίνεται η ισορροπία κατά Donnan.

Ισορροπία Donnan

	A	B
η μεμβράνη είναι περατή από το K^+ και Cl^- και όχι από το Y^-	$[K^+] = 0.1 \text{ M}$ $[Y^-] = 0.1 \text{ M}$	$[K^+] = 0.1 \text{ M}$ $[Cl^-] = 0.1 \text{ M}$
στην ισορροπία από τις δύο πλευρές της μεμβράνης	$[Y^-] = 0.1 \text{ M}$ $[K^+] = 0.133 \text{ M}$ $[Cl^-] = 0.033 \text{ M}$	$[K^+] = [Cl^-] = 0.0666 \text{ M}$

για να ισχύει η ηλεκτρική ουδετερότητα:

ΣΧΗΜΑ 4: Ισορροπία Donnan με ένα διάλυμα πολυηλεκτρολύτη



5. Μεταφορά ιόντων και δυναμικό της μεμβράνης

Τα ιόντα, όπως έχει ειπωθεί, μπορούν να περάσουν και αυτά από τις μεμβράνες. Οι ιδιότητες διάχυσης των ξεκινούν από την ηλεκτρική βαθμίδωση. Η βαθμίδωση αυτή δεν μπορεί να διατηρηθεί, χωρίς την κατανάλωση ενέργειας. Κατιόντα και ανιόντα (M^+ και A^-) περνούν την μεμβράνη ανάλογα με την εκλεκτικότητα. Αυτό σημαίνει ότι η ροή των κατιόντων δεν εξαρτάται μόνο από την συγκέντρωση του κατιόντος $[M^+]$ αλλά και από την συγκέντρωση του ανιόντος $[A^-]$. Ο ρυθμός εισροής (influx) του $[M^+]$ μέσα στο κύτταρο ή άλλο διαμέρισμα, περιγράφεται αναπόφευκτα από τον νόμο διάχυσης του Fick:

$$\text{influx } M = P_M [M^+]_e [A^-]_e$$

Όπου P_M είναι ο συντελεστής διάχυσης και $[M^+]_e$, $[A^-]_e$ οι συγκεντρώσεις των εξωκυτταρικών ιόντων.

Ο ρυθμός εκροής (efflux) από το κύτταρο είναι ίσος με:

$$\text{efflux } M = P_M [M^+]_i [A^-]_i$$

όπου $[M^+]_i$ και $[A^-]_i$ οι συγκεντρώσεις των ιόντων αυτών μέσα στο κύτταρο.

Στην ισορροπία θα ισχύει:

$$[M^+]_e [A^-]_e = [M^+]_i [A^-]_i$$

$$\text{ή } g = [M^+]_e / [M^+]_i = [A^-]_i / [A^-]_e$$

όπου g είναι η λεγόμενη ισορροπία Donnan.

Εάν η τιμή του g είναι 1, όλα τα ιόντα που υπάρχουν διαπερνούν την μεμβράνη. Συνήθως όμως, στο κύτταρο μία μεγάλη αναλογία δεσμευμένων ιόντων υπάρχουν, για παράδειγμα στις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες. Για να επιτευχθεί η ηλεκτρική ουδετερότητα θα πρέπει να ισχύει:

$$[M^+]_e = [A^-]_e$$

και για να το πετύχουμε, θα πρέπει να ισχύει παράλληλα:



$$[M^+]_i = [A^-]_i + [P_r^-]_i$$

οπότε και αυτό σημαίνει ότι:

$$[M^+]_i > [A^-]_i$$

και συνεπώς ότι ο συντελεστής ισορροπίας Donnan είναι μικρότερος του 1. Κατά συνέπεια, η συγκέντρωση των ελεύθερα διαχεόμενων ιόντων θα είναι πάντοτε υψηλότερη στο εσωτερικό από ότι στο εξωτερικό της μεμβράνης.

Η κατανομή ιόντων στις δύο πλευρές της μεμβράνης, το δυναμικό της μεμβράνης που υπάρχει, περιγράφεται από την εξίσωση του Nernst:

$$E_D = (RT / FZ) \ln([M^+]_e / [M^+]_i) = RT / FZ \ln([A^-]_i / [A^-]_e)$$

Όπου R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων, T η απόλυτη θερμοκρασία, F η σταθερά Faraday και Z το φορτίο του ιόντος. Με μετατροπή και αντικατάσταση των αντίστοιχων μεγεθών στην εξίσωση προκύπτει ότι:

$$E_D \text{ (mV)} = 62 \log([M^+]_e / [M^+]_i)$$

Η ροή διαμέσου της μεμβράνης είναι η διαφορά μεταξύ εκροής και εισροής. Σε οποιαδήποτε μεμβράνη, το δυναμικό είναι η διάχυση ιόντων που επηρεάζεται από την συγκέντρωση και την ηλεκτρική βαθμίδωση. Η εισροή επηρεάζεται κυρίως από την εξωκυτταρική συγκέντρωση. Το δυναμικό του είναι η διαφορά δυναμικού μεταξύ του εξωκυτταρικού χώρου και της μεμβράνης, η δύναμη ώθησης είναι το ηλεκτροχημικό δυναμικό B_e :

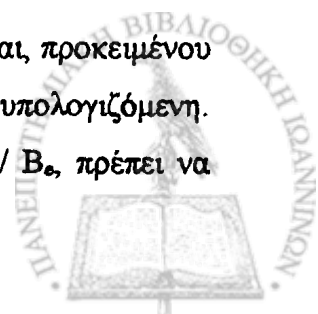
$$B_e = C_e e (ZFE_e / RT)$$

Όπου C_e είναι η εξωκυτταρική συγκέντρωση του ιόντος.

$$\text{Ο λόγος εκροής και εισροής είναι εκροή / εισροή} = B_i / B_e = C_i / C_e e (ZFE_D / RT)$$

Όπου E_D είναι η διαφορά μεταξύ E_i και E_e .

Η σχέση αυτή ονομάζεται χρησιμοποιούμενη σχέση ροής. Εφαρμόζεται, προκειμένου να βρεθεί εάν μία μετρούμενη διαφορά δυναμικού αντιστοιχεί με μία υπολογιζόμενη. Εάν ο λόγος εκροής / εισροής είναι μεγαλύτερος από τον λόγο B_i / B_e , πρέπει να



θεωρήσουμε ότι επιπλέον ενέργεια έχει καταναλωθεί, για να επιτύχουμε την μετρούμενη διαφορά δυναμικού.

6. Δομή των μεμβρανών

Οι μεμβράνες μπορεί να κατασκευάζονται από διάφορα υλικά με διαφορετικούς τρόπους, αλλά δεν υπάρχουν γενικά πολλές πληροφορίες για τον τρόπο παρασκευής τους. Χρειάζεται όμως να είναι γνωστή η γενική δομή μιας μεμβράνης για να προχωρήσουμε στην σωστή επιλογή της. Οι μεμβράνες είναι είτε πορώδεις είτε στερεές που μεταφέρουν τον διαλύτη μέσω διάχυσης και συνήθως είναι φτιαγμένες από ανόργανα υλικά ή από πολυμερή ¹⁸⁴.

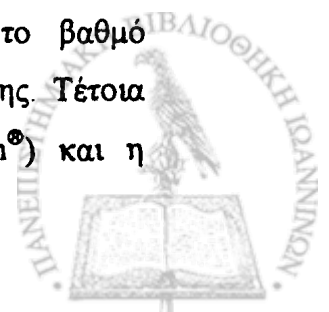
Οι μεμβράνες από πολυμερή μπορεί να είναι στερεές ή πορώδεις, ενώ οι ανόργανες είναι στην πλειοψηφία τους από μικροπορώδη υλικά.

Οι μεμβράνες επίσης μπορεί να μην έχουν ομοιογένεια στην επιφάνειά τους. Αυτό σημαίνει ότι οι ιδιότητές τους μπορεί να διαφοροποιούνται ανάλογα με το βάθος κάτω από την επιφάνεια της μεμβράνης. Μερικές φορές, αυτό μπορεί να είναι πλεονέκτημα. Η ανομοιογένεια μπορεί να προέλθει από το στάδιο της ξήρανσης ή και από άλλα στάδια της μεθόδου που χρησιμοποιείται για την κατασκευή της. Επίσης, μπορεί να γίνει σκόπιμα προετοιμάζοντας την επιφάνεια και το υπόστρωμα (βάση) σε διαφορετικά στάδια με σκοπό να βελτιωθούν οι ιδιότητες της μεμβράνης.

Οι μεμβράνες από οξική κυτταρίνη παράγονται με ξήρανση της μεμβράνης σε λεία στερεή επιφάνεια. Κατά την ξήρανση, ένα λεπτό στρώμα σχηματίζεται στην επιφάνεια που βλέπει τον αέρα ή το αέριο ενώ η υπόλοιπη μεμβράνη παραμένει πορώδης.

Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για να δημιουργηθούν τροποποιημένες (υποκατεστημένες) μεμβράνες στις οποίες ένα μεγάλο κλάσμα των υδροξυλομάδων αντικαθίσταται από άλλες ομάδες ¹⁸⁸. Μία μέθοδος αντικαθιστά ένα μεγάλο ποσοστό των υδροξυλομάδων με οξικές ομάδες. Στην μεμβράνη αυτή που προκύπτει, από (δι)οξική κυτταρίνη, ένα ποσοστό περίπου 70-80% των ομάδων έχει αντικατασταθεί.

Άλλη μέθοδος συνίσταται στην αντικατάσταση ενός σχετικά μικρού αριθμού (<5%) υδροξυλομάδων από μια άλλη χημική ομάδα που θα εμποδίσει το βαθμό αλληλεπίδρασης μεταξύ των προϊόντων ενεργοποίησης και της μεμβράνης. Τέτοια παραδείγματα είναι η υποκατάσταση με τριτοταγή αμίνη (Hemophan[®]) και η



υποκατάσταση με βενζυλομάδες που δίνει την συνθετικώς τροποποιημένη κυτταρίνη (SMC).

7. Διαδικασία διαπίδυσης βάσει πρωτοκόλλου

Το ακόλουθο πρωτόκολλο ¹⁸⁹ περιγράφει την διαπίδυση με διάχυση διαμέσου μεμβράνης από κυτταρίνη, μία τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αφαλάτωση, ή ανταλλαγή ρυθμιστικού.

Όταν ο όγκος του δείγματος είναι μεγαλύτερος από 200 ml, η διαπίδυση γίνεται τοποθετώντας το δείγμα στην μεμβράνη που είναι εμβαπτισμένη σε ρυθμιστικό επιθυμητής ιονικής ισχύος με συνεχή ανάδευση. Για μεγαλύτερους όγκους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλές μεμβράνες, αλλά κυρίως με διαπίδυση διήθησης εφαπτόμενης ροής. Επειδή ο χρόνος που παραμένει το δείγμα στο ρυθμιστικό είναι αρκετά μεγάλος, πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη το pH, η σύσταση και η ιονική ισχύς του ρυθμιστικού για την σταθερότητα της πρωτεΐνης.

Υλικά

Μεμβράνη διαπίδυσης από αναγεννημένη κυτταρίνη

50% αιθανόλη

10 mM EDTA, pH 8,0

0,05 M NaHCO₃

διάλυμα πρωτεΐνης

Ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για την διαπίδυση

1 ποτήρι ζέσεως 1 L

Για δέσιμο των μεμβρανών δύο κλείστρα, ένα ζυγισμένο και ένα μη ζυγισμένο

Πλαστικό χωνί

Αγωγιμόμετρο (προαιρετικό)

A. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

1. Επιλέγουμε την μεμβράνη με το επιθυμητό MWCO. Κόβουμε ένα μέρος από αυτή, κατάλληλου μήκους 25 cm, ώστε να μείνει και ένα τμήμα να κλειστεί (10 cm). Ο χειρισμός πρέπει να γίνει όχι με γυμνά χέρια αλλά με γάντια που δεν περιέχουν σκόνη.



2. Ανοίγουμε προσεκτικά την μεμβράνη και την ξεπλένουμε με απεσταγμένο νερό. Κατόπιν, ξεπλένουμε το εσωτερικό και το εξωτερικό μέρος της με 50% αιθανόλη. Η αιθανόλη απομακρύνει τυχόν σουλφίδια και την γλυκερόλη (χρησιμοποιείται σαν humectant).
 3. Αναμιγνύουμε 400 ml από το διάλυμα 10 mM EDTA, (pH 8,0) και 400 ml από το διάλυμα 0,05 M NaHCO₃ στο ποτήρι ζέσεως του 1 L. Εμβαπτίζουμε την μεμβράνη στο ποτήρι, και την αφήνουμε να παραμείνει για περίπου 30 min με ταυτόχρονη ανάδευση.
 4. Βγάζουμε την μεμβράνη από το διάλυμα, το οποίο αντικαθιστούμε με 800 ml απεσταγμένου νερού. Την αφήνουμε εκεί για 10 min με ταυτόχρονη ανάδευση. Έπειτα την ξεπλένουμε με απεσταγμένο νερό αρκετές φορές.
- Σημείωση α) Το βράσιμο της μεμβράνης δεν συνίσταται όταν δουλεύουμε με πρωτείνες. Για πιο ισχυρή απομάκρυνση της γλυκερόλης και των σουλφιδίων η μεμβράνη μπορεί να εμβαπτιστεί σε 1 L αιθανόλης 50% και να θερμανθεί για 1 h στους 50°C. Η αναγεννημένη κυτταρίνη μπορεί να αποστειρωθεί σε αυτόκλειστο, αλλά μπορεί να αλλάξει το MWCO της.
- β) Εάν δεν χρησιμοποιηθεί αμέσως η μεμβράνη, μπορεί να διατηρηθεί σε διάλυμα νατραζιδίου.

B. ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

1. Κλείνουμε προσεκτικά το ένα άκρο της μεμβράνης με το ζυγισμένο κλείστρο (Εναλλακτικά μπορούμε να φτιάξουμε δύο κόμπους). Απομακρύνουμε την περίσσεια νερού από το εσωτερικό της.
2. Ανοίγουμε προσεκτικά το άλλο άκρο της μεμβράνης και με την βοήθεια του χωνιού ρίχνουμε μέσα το διάλυμα της πρωτεΐνης. Όταν τελειώσουμε, απομακρύνουμε προσεκτικά τον αέρα από την μεμβράνη. Κλείνουμε και αυτό το άκρο με το μη ζυγισμένο κλείστρο (ή αλλιώς κάνουμε δύο κόμπους). Ελέγχουμε για τυχόν διαρροή εφαρμόζοντας μικρή πίεση στη μεμβράνη. Σημείωση: Η περίσσεια κενού χώρου μπορεί να οδηγήσει σε αραιώση του δείγματος αφού το ρυθμιστικό θα εισέλθει στο εσωτερικό καταλαμβάνοντας τον όγκο αυτό. Ένας κενός χώρος μπορεί να αφηθεί στην μεμβράνη όταν πρόκειται για δείγμα υψηλής συγκέντρωσης σε άλατα, καθώς είναι απαραίτητο να γίνει μία αύξηση του όγκου για να αποφευχθεί διάρρηξη της μεμβράνης. Όταν το δείγμα είναι ιζώδες, καλό είναι να αραιώνεται με το ρυθμιστικό που θα χρησιμοποιηθεί.



3. Τοποθετούμε την μεμβράνη με το δείγμα σε ένα ποτήρι ζέσεως που περιέχει έναν όγκο 10 φορές μεγαλύτερο από τον όγκο του ρυθμιστικού, βεβαιώνοντας ότι η μεμβράνη είναι πλήρως εμβαπτισμένη στο ρυθμιστικό. Ανακατεύουμε συνεχώς ώστε να μεγιστοποιηθεί η διαφορά συγκέντρωσης άλατος μεταξύ εσωτερικού και εξωτερικού της μεμβράνης. Μία μεγάλη αναλογία όγκου ($>100/1$) ρυθμιστικού προς δείγμα επιταχύνει την επίτευξη της επιθυμητής ιονικής ισχύος με λιγότερες αλλαγές στο ρυθμιστικό. Ο ρυθμός διάχυσης συνήθως μειώνεται σε χαμηλή Θ , παρόλα αυτά όμως η διαπίδυση της πρωτεΐνης μπορεί να γίνει στους 4°C για να διατηρηθεί η σταθερότητά της.
4. Μετράμε την αγωγιμότητα του ρυθμιστικού για να διαπιστώσουμε πότε θα επιτευχθεί η ισορροπία. Αντικαθιστούμε το χρησιμοποιημένο ρυθμιστικό με ίσο όγκο καινούριου όταν η αύξηση της αγωγιμότητας σταματάει. Συνεχίζουμε την αντικατάσταση του ρυθμιστικού μέχρις ότου η αγωγιμότητα παραμείνει η ίδια για 1 ή 2 ώρες.
5. Απομακρύνουμε την μεμβράνη από το ρυθμιστικό και ξεπλένουμε το εξωτερικό της με απεσταγμένο νερό. Την ανοίγουμε προσεκτικά και αδειάζουμε το περιεχόμενό της (δηλ. το dialyzed δείγμα) στο κατάλληλο δοχείο.

Γ. ΣΧΟΛΙΑ-ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Όλες οι μεμβράνες που κυκλοφορούν στην αγορά, χαρακτηρίζονται από μία MWCO τιμή. Η τιμή αυτή ορίζεται ως το MB μιας ένωσης που εμποδίζεται κατά 90% να περάσει μέσα από τους πόρους της μεμβράνης υπό ορισμένες συνθήκες. Για μερικές μεμβράνες η τιμή αυτή βασίζεται στην βαθμονόμησή τους με συγκεκριμένες σφαιρικές πρωτεΐνες, ενώ για κάποιες άλλες η βαθμονόμηση γίνεται με μίγμα δεξτρανών.

Ο βαθμός που μία πρωτεΐνη θα απορριφθεί εξαρτάται από το σχήμα, την ενυδάτωση και το φορτίο της. Οι τιμές γενικά δεν είναι απόλυτες. Είναι πιθανόν δύο πρωτεΐνες παρόμοιου MB να δείξουν τελείως διαφορετική συμπεριφορά όταν χρησιμοποιηθεί μία μεμβράνη για να τις διαχωρίσει. Επίσης, μερικά γραμμικά μόρια όπως είναι τα DNA, RNA μπορεί να περάσουν από τους πόρους μιας μεμβράνης που έχει MWCO μικρότερο από το MB τους. Υπάρχει μία βαθμιαία αύξηση στην κατακράτηση όσο το μέγεθος του μορίου προσεγγίζει και υπερβαίνει το μέσο μέγεθος των πόρων. Μόνο



όταν όλοι οι πόροι της μεμβράνης είναι μικρότεροι από το μέγεθος ενός συγκεκριμένου μορίου, το μόριο αυτό αποκλείεται από τους πόρους¹⁹⁰.

Ο διαχωρισμός δύο πρωτεϊνών που διαφέρουν στο MB με την τεχνική της διαπίδυσης ή της υπερδιήθησης είναι ημιτελής, εκτός και αν η διαφορά μεγέθους μεταξύ των είναι αρκετά μεγάλη. Από μία μελέτη¹⁹¹ έχει φανεί ότι για να γίνει αποτελεσματικός διαχωρισμός όταν αυτές βρίσκονται σε αρχική αναλογία 1/1 και να καταλήξουν σε αναλογία 10/1, απαιτείται αναλογία τιμών ανάκτησης 10/1, που αντιστοιχεί σε αναλογία MB 23/1.

Στις τεχνικές διαπίδυσης, αυτό που αναμένουμε είναι ένα μεγάλο ποσό υλικού να διαχυθεί μέσω της μεμβράνης και τα υψηλού MB συστατικά να παραμείνουν. Ο ρυθμός της διάχυσης εξαρτάται κυρίως από τους εξής τέσσερις παράγοντες: την διαφορά συγκέντρωσης της ένωσης εντός και εκτός της μεμβράνης, την σταθερά διάχυσης της, το εμβαδό της μεμβράνης και την θερμοκρασία. Τυχόν αύξηση κάποιου από τους παράγοντες αυτούς οδηγεί σε ταχεία διαπίδυση. Η διαφορά πρέπει να διατηρείται υψηλή με ταχεία ανάδευση του ρυθμιστικού, ώστε να κρατάμε την συγκέντρωση των υπό διαπίδυση ενώσεων αρκετά χαμηλή στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης καθώς και με συχνές αλλαγές του ρυθμιστικού. Επίσης, είναι καλό να αναδεύεται και το εσωτερικό της μεμβράνης, επιταχύνοντας έτσι την εσωτερική διάχυση και ελαχιστοποιώντας την πόλωση της συγκέντρωσης.

Δ. ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ

Τα προβλήματα που συναντώνται κυρίως στην τεχνική της διαπίδυσης είναι τα ακόλουθα:

1. Προσμίξεις από την μεμβράνη

Οι μεμβράνες από αναγεννημένη κυτταρίνη συνήθως περιέχουν βαρέα μέταλλα μαζί με σίδηρο, ψευδάργυρο, κασσίτερο σε συγκεντρώσεις που μπορεί να φθάνουν τα 1-10 mg/L. Επίσης, μπορεί να περιέχουν 0,1% θειούχα λόγω της επεξεργασίας που έχουν υποστεί. Για να απομακρυνθούν τα παραπάνω γίνεται η διαδικασία που περιγράφηκε ήδη. Οι μεμβράνες από εστέρα κυτταρίνης δεν περιέχουν προσμίξεις, είναι όμως λιγότερο ανθεκτικές στους οργανικούς διαλύτες και στα υψηλά pH σε σχέση με τις προηγούμενες μεμβράνες.



2. Πόλωση της συγκέντρωσης (concentration polarization)

Είναι η συσσώρευση ενός μη διαχεόμενου (rejected) μορίου στην επιφάνεια της μεμβράνης. Εξαρτάται κυρίως από την συγκέντρωση της ένωσης, την πίεση, το ιξώδες, την cross-flow (tangential) ταχύτητα και την θερμοκρασία.. Μπορεί να συμβεί ως ένα βαθμό και όταν τέτοιες ενώσεις βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Μπορεί να μειωθεί αποτελεσματικά με την ανάμιξη του διαλύματος. Μπορεί να καταστρέψει την μεμβράνη συγκεντρώνοντας ενώσεις στην επιφάνειά της. Σε όλες όμως τις περιπτώσεις, η πόλωση οδηγεί σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των απορριφθέντων συστατικών στην επιφάνεια της μεμβράνης. Μερικές φορές η πόλωση της συγκέντρωσης οδηγεί και σε καταβύθιση του συστατικού στην επιφάνεια.

3. Προσρόφηση της πρωτεΐνης στην μεμβράνη

Ακόμη και με τις πιο κατάλληλες μεμβράνες μπορεί να συμβούν απώλειες στην πρωτεΐνη της τάξεως του 1 έως 5%. Η φύση του ρυθμιστικού μπορεί να επηρεάσει την προσρόφηση. Έτσι, τα ρυθμιστικά φωσφορικών παρουσιάζουν μεγαλύτερο πρόβλημα από τα αντίστοιχα Tris.

4. Καταβύθιση της πρωτεΐνης

Η αφαλάτωση καταλήγει μερικές φορές και στην καταβύθιση μίας ποσότητας από την πρωτεΐνη. Αν και το αδιάλυτο μέρος μπορεί να απομακρυνθεί με φυγοκέντρηση, καλό θα ήταν να βεβαιωθούμε πριν αποχύσουμε το υπερκείμενο υγρό. Αν η πρωτεΐνη έχει πλήρως καταβυθιστεί μπορούμε να την επαναδιαλύσουμε σε ρυθμιστικό υψηλότερης ιονικής ισχύος.

5. Απαιτούμενος χρόνος

Όταν πρόκειται για όγκους μικρότερους από 10 ml απαιτούνται συνήθως 6 με 12 ώρες ενώ για όγκους από 10 έως 200 ml, απαιτούνται 12 έως και 24 ώρες. Ο χρόνος αυτός μπορεί να μειωθεί όπως έχει ειπωθεί και σε άλλα σημεία προηγουμένως με συχνή αλλαγή του ρυθμιστικού, αυξάνοντας την αναλογία όγκου ρυθμιστικού/δείγματος, αυξάνοντας το εμβαδόν της επιφάνειας της μεμβράνης και μετρώντας την αγωγιμότητα του ρυθμιστικού.



6. Στόμωση της μεμβράνης

Ο όρος αυτός αναφέρεται σε έναν αριθμό φαινομένων που μπορεί να διασπάσουν την μεμβράνη ή να μπλοκάρουν την επιφάνειά της. Τα συστατικά αυτά μπορεί να είναι ο διαλύτης, η διαχωριζόμενη ένωση ή οποιαδήποτε άλλη. Για παράδειγμα, το διαλυμένο οξυγόνο μπορεί να επηρεάσει ως ένα βαθμό μεμβράνες οργανικών πολυμερών, ενώ δεν θεωρείται σαν συστατικό του διαλύματος.

Τα αιωρούμενα στερεά μπορεί να καταστρέψουν την επιφάνεια της μεμβράνης ιδίως σε τεχνικές ανάστροφης όσμωσης όπου εφαρμόζεται πίεση.

Σε υδατικά συστήματα με την ανάστροφη ώσμωση, οι μεμβράνες μπορεί επίσης να στομώσουν από την βιομάζα, καθώς αυτή φιλτράρεται ή όταν αναπτύσσεται στην επιφάνεια της μεμβράνης. Εάν το κυρίως διάλυμα περιέχει σημαντικούς μικροοργανισμούς και/ή θρεπτικά υλικά, τότε η στόμωση αποτελεί μεγάλο πρόβλημα. Το υπόγειο νερό περιέχει μικροοργανισμούς και θρεπτικά υλικά, ιδίως όταν αυτό βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια του εδάφους. Τα λύματα μπορεί να είναι αποστειρωμένα ή να περιέχουν όπως και το υπόγειο νερό μικροοργανισμούς.

Σε τεχνικές που χρησιμοποιούν περιβαλλοντικά δείγματα, ένας άλλος παράγοντας που μπορεί να περιορίσει τον βαθμό συγκέντρωσης είναι η συγκέντρωση των κατιόντων όπως ασβέστιο ή μαγνήσιο και ανιόντων όπως θειικά ή ανθρακικά. Αυτό συμβαίνει λόγω της χαμηλής διαλυτότητας των αλάτων που σχηματίζονται. Για το λόγο αυτό, καλό είναι να προστεθεί μικρή συγκέντρωση οξέος, ώστε να μειωθεί το pH και η συγκέντρωση των ανθρακικών. Αυτό βέβαια έχει μικρή επίδραση στο σχηματισμό των αδιάλυτων θεικών στην επιφάνεια της μεμβράνης. Παράγεται όμως CO₂ που περνάει από την μεμβράνη με το νερό. Επίσης, τα πυριτικά όταν βρίσκονται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 100 mg/L μπορεί να οδηγήσουν σε στόμωση της μεμβράνης.

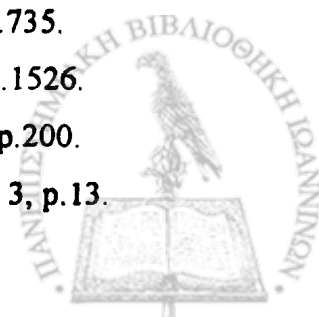


ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

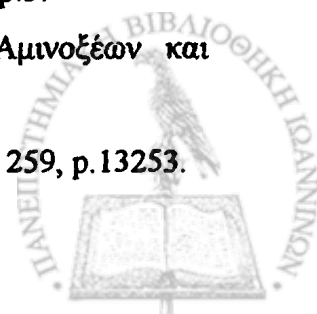
1. Αλμπάνη, Τ. Α., 'Ρύπανση και Τεχνολογία Προστασίας Περιβάλλοντος', Ιωάννινα, 1994.
2. Βαλκανά Γ., 'Ρύπανση Περιβάλλοντος. Επιστήμη και Τεχνική Αντιμετώπισης', Αθήνα, 1992.
3. Μαρκαντωνάτος, Γ., Επεξεργασία και διάθεση υγρών αποβλήτων, Αθήνα, 1990.
4. Manahan, S. E., 'Environmental Chemistry', 6th edition, CRC Press Inc., West Palm Beach, FL, USA, 1994.
5. Rump, H. H., Krist, H., 'Laboratory Manual for the Examination of Water, Wastewater and Soil', 2nd edition, VCH, Weinheim, 1992.
6. Dean, J. A., 'Analytical Chemistry Handbook', Mc Graw-Hill, New York, 1995.
7. Thomas, O., *Environ. Technol.*, 1993, 14, p.1187.
8. Thomas, O., Gallot, S. and Mazas, N., *Fres. J. Anal. Chem.*, 1990, 338, p.238.
9. Thomas, O., Gallot, S. and Naffrechoux, E., *Fres. J. Anal. Chem.*, 1990, 338, p.241.
10. Thomas, O., Mazas, N., Gallot, S. and Clement, B., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1993, 52, p.179.
11. Κώττη, Μ., 'Προσδιορισμός των κυριότερων παραμέτρων ποιότητας των απονέρων με τις πρότυπες μεθόδους και με την πολυπαραμετρική μέθοδο βασισμένη στο φάσμα απορρόφησης στην περιοχή του υπεριώδους', Master Thesis, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 1998.
12. Skogerboe, R. K. and Wilson, S.A., *Anal. Chem.*, 1981, 53, 228-232.
13. Eckert, J. M., Stewart, J. J., Waite, T. D., Szymczak, R. and Williams, K. L., *Anal. Chim. Acta*, 1990, 236, 357-363.
14. Deng Y. and Stumm, W., *Aquat. Sci.*, 1993, 55, p.103.
15. Antweiler, R. C. and Drever, J. I., *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1983, 47, p.623.
16. Cronan, C. S. and Aiken, G. R., *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1985, 49, p.1697.
17. Hinman, N. W., *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1990, 54, 1563-1574.
18. MacGowan, D. B. and Surdam, R. C., *Appl. Geochem.*, 1990, 5, p.687.
19. Bennett, P. C., *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1991, 55, p.1781.



20. MacCarthy, P. and Rice, J. A., in 'Humic Substances in Soil, Sediment and Water', eds. Aiken, G. R., McKnight, D. M., Wershaw, R. L. and MacCarthy, P., John Wiley & Sons, NY, 1985, 527-559.
21. Bloom, P. R. and Leenheer, J. A., in: 'Humic Substances II', eds. Hayes, M. H. B., MacCarthy, P. Malcolm, R. L. and Swift, R. S., p.409-446, John Wiley & Sons, New York, 1989.
22. Chin, Y. P., Aiken, G. and O'Loughlin, F., *Environ. Sci Technol.*, 1994, 28, p.1853.
23. Traina, S. J., Novak, J. and Smeck, N. E., *J. Environ. Qual.*, 1990, 19, p.151.
24. Novak, J. M., Mills, G. L. and Bertsch, P., *J. Environ. Qual.*, 1992, 21, p.144.
25. Korshin, G. V., Li, C. W. and Benjamin, M. M., *Wat. Res.*, 1997, 31(7), p.1787.
26. Clement, B. and Thomas, O., *Environ. Technol.*, 1995, 16, p.367.
27. Smith, E. H. and Weber, W. J. JR, *Water, Air, and Soil poll.*, 1990, 53, p.279.
28. Gourdon, R., Comel, C., Vermande, P. and Veron, J., *Wat. Res.*, 1989, 23 (2), p.167.
29. Thurman, E. M., "Organic Geochemistry of Natural Waters", Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1985.
30. Peuravuori, J. and Pihlala, K., *Anal. Chim. Acta*, 1998, 363, p.235.
31. Peuravuori, J. and Pihlala, K., *Anal. Chim. Acta*, 1998, 364, p.203.
32. Stevenson, F. J., 'Humus Chemistry Genesis Composition, Reactions', Wiley Interscience, New York, 1982.
33. Buffle, J., Greter, F. L., Haerdi, W., *Anal. Chem.*, 1982, 49, p.216
34. Schnitzer, M. and Khan, S. U., "Humic Substances in the Environment", Marcel Dekker, New York, 1972.
35. Buffle, J., Deladoey, P. and Haerdi, W., *Anal. Chim. Acta*, 1978, 101, p.339
36. Underdown, A. W., Langford, C. H. and Gamble, D. S., *Anal. Chem.*, 1981, 53, p.2139.
37. Suffet, I. H., MacCarthy, P. (Eds.), 'Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants', Advances in Chemistry Series No.219, ACS, Washington, DC, 1989.
38. Carter, C. W. and Suffet, I. H., *Environ. Sci. Technol.*, 1982, 16(11), p.735.
39. Hassett, J. P. and Anderson, M. A., *Environ. Sci. Technol.*, 1979, 13, p.1526.
40. Matsuda, K., Schnitzer, M., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1973, 6, p.200.
41. Pena-Mendez, E. M., Harel, J. and Patocka, J., *J. Appl. Biomed*, 2005, 3, p.13.



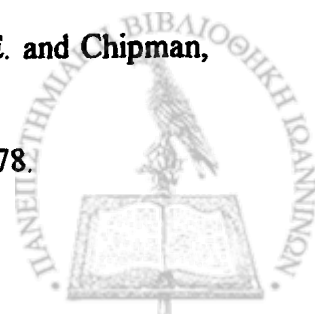
42. Ghosh, K. and Schnitzer, M., *Soil Sci.*, 1980, 129, p.266.
43. Lee, M. C., Snoeyink, V. L. and Crittenden, J. C., *J. Am. Water Works Assoc.*, 1981, 73, p.440.
44. Thurman, E. M. and Malcolm, R. L., *Environ. Sci. Technol.*, 1981, 15, p.463.
45. O'Connor, D. J. and Conally, J. P., *Wat. Res.*, 1980, 14, p.1517.
46. Hautala, K., Peuravuori, J. and Pihlala, K., *Wat. Res.*, 2000, 34(1), p.246
47. Senesi, N. and Steelink, C. Application of ESR spectroscopy to the study of humic substances in: Hayes, M. H. B., MacCarthy, P., Malcom, R. L. and Swift, R. S. (eds). 'Humic Substances II. In search of structure', John Wiley & Sons, 1989, 374-408.
48. Traina, S. J., Novak, J. and Smeck, N. E., *J. Environ. Qual.*, 1990, 19, p.151.
49. Peuravuori, J. and Pihlaja, K., *Anal. Chim. Acta*, 1997, 337, p.133.
50. Huber, S. and Frimmel, F., *Vom Wasser*, 1996, 86, p.277
51. Kudryavsev, A. V., Perminova, I. V. and Petrosyan, V. S., *Anal. Chim. Acta*, 2000, 407, p.193
52. Chin, Y. P., Cschwend, P. M., *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1991, 55, p.1309.
53. Reid, P. M., Wilkinson, A. E., Tipping, E. and Jones, M. N., *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1990, 54, p.131.
54. Beckett, R., Jue, Z. and Giddings, J. C., *Environ. Sci. Technol.*, 1987, 21, p.289.
55. Perminova, I. V., Frimmel, F. H., Kovalevskii, D. V., Abbt-Braun, G., Kudryavtsev, A. V. and Hesse, S., *Wat. Res.*, 1998, 32(3), p.872.
56. Vijay-Kumar S., Bugg C. E., Cook, W.J., *J. Mol. Biol.*, 1987, p.531
57. Di Stefano D. L. and Wand A. J., *Biochemistry*, 1987, 26, p.7272
58. Weber, P. L., Brown, S. C., Mueller, L., *Biochemistry*, 1987, 26, p.7282.
59. Derchamps, J. R., George, C., Flippen-Anderson, J. L., *Biopolymers*, 1996, 40, p.121.
60. Terzi, E., Holzemann, G., Seelig, J., *Biochemistry*, 1994, 33, p.7434
61. Hodges, R. S., Mant, C. T. in: Mant, C. T., Hodges, R. S., 'HPLC of Peptides and Proteins: Separation, Analysis and Conformation', CRC Press, Boca Raton, 1991, 3.
62. Mant, C. T., Hodges, R. S., *Methods in Enzymology*, vol. ;, 1996, p.3.
63. Τσιγγάνος, Κ. Π, Βιοχημεία Πεπτιδίων Ι, στο: 'Χημεία Αμινοξέων και πρωτεϊνών', Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, 1999.
64. Lau, S. Y. M., Taneja, A. K., Hodges, R. S., *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, p.13253.



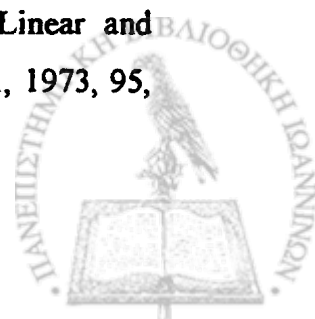
65. Kato, Y., Komiya, K., Sasaki, H., Hashimoto, T., *J. Chromatogr.*, 1980, 193, p.458.
66. Sculc, M., Mhatre, R., Mazzeo, J., Krull, I.S., *Methods in Enzymology*, 1996, 270, p.175.
67. Kohn, W. D., Monera, O. D., Kay, C. M. and Hodges, R. S., *J. Biol. Chem.*, 1994, 270, p.25495
68. Yang, J. J., Pitkeathly, M., Radford, S. E., *Biochemistry*, 1994, 33, p.7345.
69. Kopaciewicz, W., Regnier, F. E., *Anal. Biochem.*, 1982, 126, p.8.
70. Pfannkoch, E., Lu, K. C., Regnier, F. E., Barth, H. G., *J. Chromatogr. Sci.*, 1980, 18, p.430.
71. Irvine, G. B., Shaw, C., *Anal. Biochem.*, 1986, 155, p.141.
72. Chen, Y., Frignant, C., Rinaudo, M., *Carbohydr. Polym.*, 1997, 33, p.73.
73. Picton, L., Merle, L., Muller, G., *Int. J. Polym. Anal. Charact.*, 1996, 2, p.103.
74. Delker, G., Chen, C., Miller, R. B., *Chromatographia*, 1995, 4, p.263.
75. Majcherczyk, A., Huettermann, A., *J. Chromatogr. A*, 1997, 764, p.183.
76. Ristolainen, M., Alen, R., Knuutinen, *J. Holzforschung*, 1996, 50, p.91.
77. Cadahia, E., Conde, E., Garcia-Vallejo, M. C., Fernandez de Simon, B., *Chromatographia*, 1996, 41, p.95.
78. Wong, K. K. Y. and de Jong, E., *J. Chromatogr. A*, 1996, 737 (2), p.19.
79. Verzele, M., Delahaye, P. and Van Damme, F., *J. Chromatogr. A*, 1986, 362, p.363.
80. Schuessler, H., Distel, L., Sieber, R., *Int. J. Radiat. Biol.*, 1997, 71, p.543.
81. Ferreira, G., Cabral, J., Prazeres, D., *Biotechnol. Tech.*, 1997, 11, p.417.
82. De Mora, S. J. and Harrison, R. M., *Wat. Res.*, 1983, 17 (7), p.723
83. Hudson, J.J., Taylor, W. D., Schindler, D. W. *Nature*, 2000, 406, p.54.
84. Brandl, H., and Hanselmann, K.W., *Aquatic Sciences*, 1991, AWSCEA, 53(1), p.55.
85. Benes, P. and Steinnes, E., *Wat. Res.*, 1975, 9, p.741
86. Guy, R. D. and Chakrabarti, G. L., *Can. J. Chem.*, 1976, 54, p.2600.
87. Truitt, R. E. and Weber, J. H., *Anal. Chem.*, 1981, 53, p.337
88. Guy, R. D. and Bourque, C., *Symposium of the Proceedings of the International Conference on Heavy metals in the Environment, Amsterdam*, 1981, p.577.
89. Florence, T. M. and Batley, G.E., *Talanta*, 1977, 24, p.151.



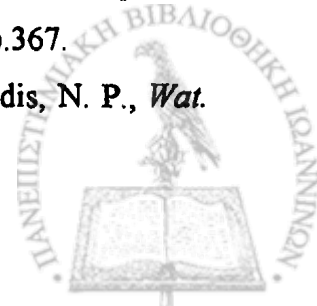
90. van de Merbel, N. C., Teule, J. M., Lingeman, H., Brinkman, U. A. Th., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1992, 10, p.225.
91. Herraiez-Hernadez, R., van de Merbel, N. C., Brinkman, U. A. Th., *J. Chromatogr.*, 1995, 666, p.1077.
92. van de Merbel, Lagerwerf, F. M., J. M., Lingeman, H., Brinkman, U. A. Th., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1994, 54, p.105.
93. Johansen, K., Krogh, M., Rasmussen, K. E., *J. Chromatogr. B*, 1997, 690, p.223.
94. Johansen, K., Rasmussen, K. E., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998, 16, p.1159.
95. Cooper, J. D. H., Turnell, D. C., Green, B., Verillon, F., *J. Chromatogr.*, 1988, 456, p.53.
96. Andresen, A. T., Ramsussen, K. E., Rugstad, H. E., *J. Chromatogr.*, 1993, 621, p.189.
97. Verette, E., Qian, F., Mangani, F., *J. Chromatogr. A*, 1995, 705, p.195
98. Farjam, A., van de Merbel, N. C., Nieman, A. A., Lingeman, H. Brinkman, U. A. Th., *J. Chromatogr.*, 1992, 589, p.141.
99. Tsutsuki, K. and Kuwatstuka, S., *Soil Sci. Plant Nutr.*, 1984, 30, p.151.
100. Murphy, E. M., Zachara, J. M., Smith, S. C., Phillips, J. L. and Wietsma, T. W., *Environ. Sci. Technol.*, 1994, 28, p.1291.
101. Crum. R. H., Murphy, E. M. and Keller, C. K., *Wat. Res.*, 30(5), 1996, p.1304
102. Cai, Y., *Wat. Res.*, 1999, 33(13), p.3056.
103. Logan, B. E. and Jiang, Q., *J. Environ. Eng.*, 1990, 116, p.1046
104. Sun, L., Perdue, E. M. and McCarthy, J. F., *Wat. Res.*, 1995, 29(6), 1471-1477.
105. Ma, H., Allen, H. E. and Yin, Y., *Wat. Res.*, 2001, 35(4), p.985.
106. Vogt, R. D. et al., Proceedings of the 9th Nordic IHSS Symposium, Abundance and Fuctions of Natural Organic Matter Species in Soil and Water, Mid. Sweden University, May 19-21, 2003.
107. Leenheer, J. A. and Huffman, E. W. D., *Water-Resources Invest. U. S. Geol. Surv.*, 1979, 79/4.
108. Qualls, R. G. and Haines, B. L., *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1991, 55, p.1112.
109. Leenheer, J. A., *Envir. Sci. Technol.*, 1981, 15(5), p.578.
110. Watt, B. E., Malcolm, R. L., Hayes, M. H. B., Clark, N. W. E. and Chipman, J. K., *Wat. Res.*, 1996, 30(6), p.1502.
111. Stuer-Lauridsen and Kjolholt, J., *Wat. Res.*, 2000, 34(13), p.3478.



112. Christensen J. B., Jensen, D. L., Gron, C., Filip, Z. and Christensen, T. H., *Wat. Res.*, 1998, 32(1), p.125.
113. Fujita, Y., Ding, W-H. and Reinhard, M., *Water Environ. Res.*, 1996, 68(5), p.867.
114. Nielen, M. W. F., Brinkman, U. A. Th. And Frei, R. W., *Anal. Chem.*, 1985, 57, p.806
115. Lobbes, J. M., Fitznar, H. P., Kattner, G., *Anal. Chem.*, 1999, 71, p.3008.
116. Negroao, M. R. and Alpendurada, M. F., *J. Chromatogr. A*, 1998, 823, p.211.
117. de Alda, M. J. L. and Barcelo, D., *J. Chromatogr. A*, 2001, 911, p.203.
118. Bobeldijk, I. Brandt, A., Wullings, B. and Noij, Th., *J. Chromatogr. A*, 2001, 918, p.277
119. Farre, M., Kloter, G., Petrovic, M., Alonso, M. C., de Alda, M. J. L. and Barcelo, D., *Anal. Chim. Acta*, 2002, 456, p.19
120. Fernandez, J. M., Vazquez, P. P. and Vidal, J. L. M., *Anal. Chim. Acta*, 2000, 412, p.131.
121. Schuster, R., Application note, Hewelett Packard, Co., 1991
122. Marcomini, A., Capri, S. and Giger, W., *J. Chromatogr.*, 1987, 403, p.243.
123. Abel, M. and Giger, W., *Anal. Chem.*, 1985, 57(8), p.1577.
124. Casteles, M. A. Moore, B. L. and Ward, S. R., *Anal. Chem.*, 1989, 61(22), p.2534.
125. Roy-Keith Smith, Handbook of Environmental analysis, 4th ed., Genium Publishing Corporation, Canada, 1999
126. Massart, D. L., Vandeginste, B. G. M., Byudens, L. M. C., De Jong, S., Lewi, P. J., Kowalski, B. R., 'Pattern Recognition in Chemical Research', in 'Computers in Chemical and Biochemical Research', vol. 2, Klopfenstein, C. E. and Wilkins, C. L. (eds), Academic Press, NY, 1974.
127. Kowalski, B. R., Chemometrics: views and propositions, *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, 1975, 15, p.201
128. Kowalski, B. R. and Bender, C. F., 'Pattern Recognition. A Powerful Approach to Interpreting Chemical Data', *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, 94, 5632
129. Kowalski, B. R. and Bender, C. F., 'Pattern Recognition. II. Linear and Nonlinear Methods for Displaying Chemical data', *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, 95, 686.
130. Stone, W., *J. R. Stat. Soc.*, 1974, B38, 111



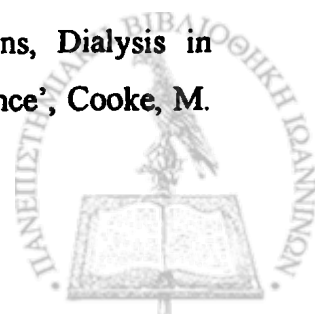
131. Λύκας Α., 'Υπολογιστική Νοημοσύνη', Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Πληροφορικής, Ιωάννινα, 2002.
132. Zarada, J. M., Introduction to artificial neural networks, West Publishing company, St. Paul, MN, 1992.
133. Freeman, J. A. and Skapura, D. M., Neural Networks, Algorithms, Applications, and Programming Techniques', Addison-Wesley Publishing company, Reading, MA, 1991.
134. Farragi, D. and Simon, R., *Stat. Med.*, 1995, 14, p.73.
135. Brion G. M., Lingireddy, S., *Wat. Res.*, 1999, 33 (14), p.3099.
136. Sovan, L., Guiresse M., Giraudel, Jean-Luc, *Wat. Res.*, 1999, 33 (16), p.3469.
137. Lek, S., Dimopoulos, I. and Fabre, A., *Acta Oecol.*, 1996, 17, p.43.
138. Brodnjak-Voncina, D., Dobcnik, D., Novic, M., Zupan, J., *Anal. Chim. Acta*, 2002, 462 (1), p.87.
139. Zupan, J., Gasteiger, J., *Anal. Chim. Acta*, 1991, 248, p.1.
140. Cote, M., Grandjean, B. P. A., Lessard, P. and Thibault, J., *Wat. Res.*, 1995, 29, p.995.
141. Smits, J. R. M., Melssen, W. J., Buydens, L. M. C. and Kateman, G., Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 1994, 22, p.165-189.
142. Lek, S., Belaud, A. Baran, P., Dimopoulos, I. and Delacoste, M., *Aquat. Living Resour.*, 1996, 9, p.23.
143. Lek, S., Delacoste, M., Baran, P., Dimopoulos, I., Lauga, J. and Aulanier, S. *Ecol. Model.*, 1996, 90, p.39
144. Scardi, M., *Marine Ecol. Prog. Ser.*, 1996, 139, p.289
145. Baran, P., Lek. S., Delacoste, M. and Belaud, A., *Hydrobiologia*, 1996, 337, p.1.
146. Χαλικιάς, Ι. Γ., 'Στατιστικές μέθοδοι: Ανάλυση Παλινδρόμησης, Ανάλυση Διακύμανσης', Β έκδοση, Ευγ. Μπένου, Αθήνα, 1999.
147. Σιάρδος, Γ. Κ., 'Μέθοδοι Πολυμεταβλητής Στατιστικής ανάλυσης, Μέρος πρώτο Διερεύνηση σχέσεων μεταξύ μεταβλητών', Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη, 1999.
148. Jordan, M. M., Mateu, J. and Boix, A., *Wat. Air. Soil. Poll.*, 1998, 107, p.91
149. Vidal, M. and Melgar, M. J., *Wat. Air. Soil. Poll.*, 2000, 121, p.367.
150. Kotti, M. E., Vlessidis, A. G. Thanasoulas, N. C. and Evmiridis, N. P., *Wat. Res. Management*, 2004, 19, p.1.



151. Thanasoulis, N. C., Piliouris, E. T., Kotti, M-S. E. and Evmiridis, N. P., *For. Sci. Int.*, 2002, 130, p.73.
152. Massart, D. L., Kaufman, L., 'Interpretation of Analytical Chemical Data by the use of Cluster Analysis', Wiley, NY, 1983.
153. Shand, C. A., Smith, S., Edwards, A. C. and Fraser, A. R., *Wat. Res.*, 2000, 34(4), p.1278.
154. Rostad, C. E., Leenheer, J. A., Daniel, S. R., *Environ. Sci. Technol.*, 1997, 31(11), p.3218.
155. [http:// www.expasy.org/tools](http://www.expasy.org/tools)
156. Spector, M. S, Easwaran, K. R. K., Jyothi, G., Selinger, J. V., Singh, A., and Schnur, J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, p.12943.
157. Lough, W. J. and Wainer, I. W (ed.) High performance Liquid Chromatography Fundamental Principles and Practice, Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, 1996, UK.
158. Snyder, L. R., Dolan, J. W. and Gant, G. R., *J. Chromatogr.*, 1979, 165(3), p.31.
159. Kotti, M. E., Vlessidis, A. G., Evmiridis, N. P., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, 379, p.818
160. Whittaker, D., 'Interpreting organic spectra', RSC, UK, 2000
161. Varian Star Library, Excel 95/5.0 version, Nov. 1998.
162. Simons, W. (ed.), The Sadler Band of UV spectra, Sadtler Research Lab, 1979, 1017
163. Lindsay, S., 'High Performance Liquid chromatography', John Wiley & Sons, 1987.
164. Hamilton, R. J., Sewell, P. A., 'Introduction to High Performance Liquid Chromatography, Chapman & Hall, New York, 1982.
165. Schoenmakers, P. J., Billiet, H. A. H., Degalan, L., *Chromatographia*, 1982, 15 (6), p.387.
166. Robards, L., Haddad, P. R. and Jackson, P. E. (eds), Theory of Chromatography in: 'Principles and Practice of Modern Chromatographic methods', Academic Press Inc., 1994.
167. Scott, R. P. W. and Kukera, P., *J. Chromatogr.*, 1979, 175 (1), p.51
168. Snyder, L. R. 'Principles of absorption chromatography, Marcel Dekker, New York, 1968



169. Stadalius, M. A., Berus, J. S. and Snyder, L. R., *LC-GC*, 1988, 6, 495
170. Melander, W. R. and Horvath, Cs., in Cs Horvath (editor), 'High Performance Liquid Chromatography - Advances and Perspectives', vol. 2, Academic Press, NY, 1980.
171. Dondi, F., Kahie, Y. D., Lodi, G., Blo, C., Pietrogrande and Reschiglian, R., *J. Chromatogr.*, 1989, 461, p. 281.
172. Sinanoglou, O. in Pullman (ed.), 'Molecular Association in Biology', Academic Press, New York, 1968, 427.
173. Schoenmakers, P. J. and Tijssen, R., *J. Chromatogr A*, 1993, 656 (1-2), p.577
174. Ευμοιρίδης, Ν. Π., Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης στο: 'Τεχνικές Χρωματογραφίας στην Αναλυτική Χημεία', Ιωάννινα, 2001.
175. Valko, K., Snyder, L. R. and Glajch, J. L., *J. Chromatogr. A.*, 1993, 656, p.501.
176. Porath, J. and P. Flodin, *Nature*, 1959, 183, p.1657
177. Moore, J. C., *Polymer Sci. A2*, 1964, 835.
178. Potschka, M., *Anal. Biochem.*, 1987, 162, p.47.
179. Dubin, P. L., Principi, J. M., *Macromolecules*, 1989, 22, p.1891.
180. Himmel, M. E., Squire, P. G., *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1981, 17, p.365.
181. Dubin, P. L., Edwards, S. L., Mehta, M. S., Tomalia, D., *J. Chromatogr.*, 1993, 635, p.51.
182. Pfannkoch, E., Lu, K. C., Regnier, F. E., Barth, H. G., *J. Chromatogr. Sci.*, 1980, 18, p.430.
183. Gel Filtration Principles and Methods, 6th ed., Pharmacia Publication 18-1022-18, 1993, ISBN 91-97-0490-2-6.
184. Watson, J. S. 'Separation methods for waste and environmental applications', Marcel Dekker Inc., NY, 1999.
185. D. T. E. Hunt & A. C. Wilson, 'Chemical analysis of Water: General Principles and Techniques', 2nd ed., RSC, 1986.
186. LaZerte, B. D., *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 1984, 41, p.766.
187. K. E. Van Holde, 'Physical Biochemistry', 2nd ed., Prentice-Hall, Inc., USA, 1985.
188. Clark, W. R. and Lysaght, M. J., II/Membrane separations, Dialysis in Medical separations, 1690, in: 'Encyclopedia of Separation Science', Cooke, M. and Poole, C. F., Academic Press.



189. Philips, A. T., *Current Protocols in Protein Science-sample Unit*, John Wiley & Sons, Inc., 2001.
190. Saltonstall, C. W., Separations with dialysis and ultrafiltration: Theoretical and practical considerations, *Am. Biotechnol. Lab.*, 1992, 10, p.32.
191. Saltonstall, C. W., 'Dialysis and ultrafiltration: Estimating quantitative separations', *Am. Biotechnol. Lab.*, 1992, 10, p.18.

