



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Χρωματογραφικός προσδιορισμός οργανοφωσφορικών
ενώσεων περιβαλλοντικού και βιολογικού ενδιαφέροντος
μέσω μικροεκχύλισης με χρήση κεραμικών υλικών
και τροποποιημένων πολυμερικών ινών**

ΑΦΡΟΔΙΤΗ ΣΦΑΚΙΑΝΑΚΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ, MSc

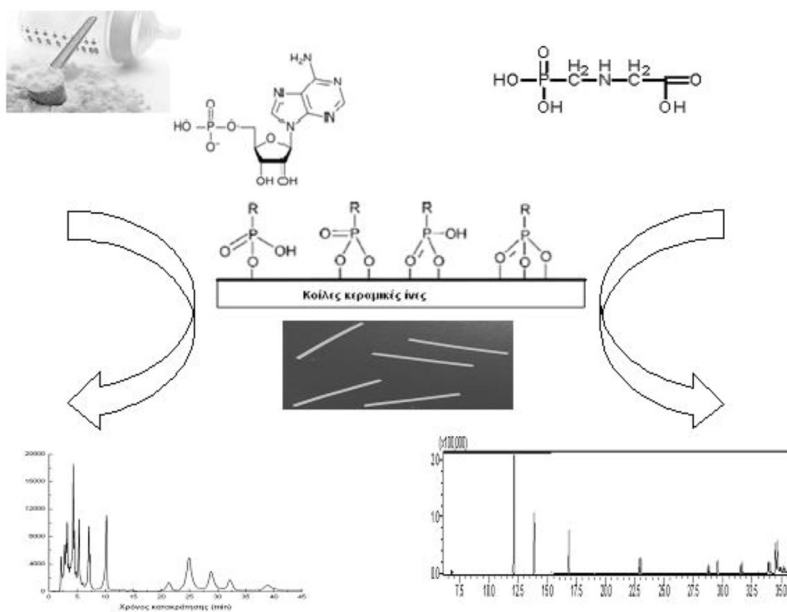
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Χρωματογραφικός προσδιορισμός οργανοφωσφορικών
ενώσεων περιβαλλοντικού και βιολογικού ενδιαφέροντος
μέσω μικροεκχύλισης με χρήση κεραμικών υλικών
και τροποποιημένων πολυμερικών ινών**



ΑΦΡΟΔΙΤΗ ΣΦΑΚΙΑΝΑΚΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών
Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του
συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σταλίκας Κωνσταντίνος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων

Πομόνης Φίλιππος, Ομότιμος Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων

Αλμπάνης Τριαντάφυλλος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων

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

Προς την Γραμματεία του Τμήματος Χημείας
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ιωάννινα 23 Οκτωβρίου 2015

**ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΤΗΣ ΥΠΟΨΗΦΙΑΣ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΟΣ κ. ΑΦΡΟΔΙΤΗΣ ΣΦΑΚΙΑΝΑΚΗ**

Σήμερα στις 23 Οκτωβρίου 2015 και ώρα 9:30 πμ, η επταμελής εξεταστική επιτροπή αποτελούμενη από τους:

1. Σταλίκας Κωνσταντίνος, Καθηγητή Τμ. Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων (επιβλέποντα)
2. Πομόνης Φίλιππος, Ομότιμο Καθηγητή Τμ. Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Αλμπάνη Τριαντάφυλλο, Καθηγητή Τμ. Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Βλεσσίδη Αθανάσιο, Καθηγητή Τμ. Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Πετράκης Δημήτριος, Αναπλ. Καθηγητή Τμ. Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Προδρομίδης Μάμαντος, Αναπλ. Καθηγητή Τμ. Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Σακκάς Βασίλειος, Επικ. Καθηγητή Τμ. Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων

που ορίστηκε με την απόφαση του Τμήματος Χημείας (Συνεδρίαση 915^Α/15-9-2015), συνήλθε στην αίθουσα Χ2-097, του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και παρακολούθησε τη δημόσια παρουσίαση της διατριβής της υποψήφιας διδάκτορος κ. Αφροδίτης Σφακιανάκη με θέμα: **“Χρωματογραφικός προσδιορισμός οργανοφωσφορικών ενώσεων περιβαλλοντικού και βιολογικού ενδιαφέροντος μέσω μικροεκχύλισης με χρήση κεραμικών υλικών και τροποποιημένων πολυμερικών ινών”**.

Η κ. Σφακιανάκη ανέπτυξε επί μία περίπου ώρα τα κυριότερα αποτελέσματα της διατριβής της, απάντησε σε ερωτήσεις του ακροατηρίου και στη συνέχεια σε ερωτήματα της εξεταστικής επιτροπής. Στη συνέχεια αποχώρησε η κ. Σφακιανάκη μαζί με το ακροατήριο, ενώ η επταμελής εξεταστική επιτροπή μετά από σύσκεψη και λεπτομερή συζήτηση έκρινε ότι η διατριβή είναι πρωτότυπη και συμβάλλει στην εξέλιξη της επιστήμης κι έτσι αποφάσισε ομόφωνα να προτείνει στη Γενική Συνέλευση Ε.Σ. την απονομή στην κ. Αφροδίτη Σφακιανάκη του τίτλου της διδάκτορος του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με βαθμό "Άριστα" (δέκα-10).

Η Εξεταστική Επιτροπή

Καθηγητής Σταλίκας Κωνσταντίνος (επιβλέποντα)

Ομότιμος Καθηγητής Πομόνης Φίλιππος

Καθηγητής Αλμπάνης Τριαντάφυλλος

Καθηγητής Βλεσσίδης Αθανάσιος

Αναπλ. Καθηγητής Πετράκης Δημήτριος

Αναπλ. Καθηγητής Προδρομίδης Μάμαντος

Επικ. Καθηγητής Σακκάς Βασίλειος

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

	 ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ <i>επένδυση στην κοινωνία της γνώσης</i>	 ΕΣΠΑ 2007-2013 πρόγραμμα για την ανάπτυξη
Ευρωπαϊκή Ένωση Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο	ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ	  ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης		

«Εν οίδα ότι ουδέν οίδα»

Σωκράτης

Αφιερώνεται στην κορούλα μου,

Πηνελόπη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με επιβλέποντα τον Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Κωνσταντίνο Σταλικά. Την τριμελή συμβουλευτική επιτροπή συμπληρώνουν ο Ομότιμος Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Φίλιππος Πομώνης και ο Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Τριαντάφυλλος Αλμπάνης.

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

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

Επίσης, ευχαριστώ θερμά και τα υπόλοιπα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Τριαντάφυλλο Αλμπάνη και τον Καθηγητή κ. Φίλιππο Πομόνη, για τις σημαντικές υποδείξεις τους, τα εύστοχα σχόλια, το συνεχές ενδιαφέρον και την άμεση συνεργασία κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες ανήκουν και στους φίλους και συναδέλφους μου, Δρ. Δημήτρη Στεργίου και Δρ. Παναγιώτη Δημοβασίλη, Έφη Παπαρίζου και Δρ. Τάσο Παληό, για τις εποικοδομητικές συζητήσεις, τις πολύτιμες συμβουλές, την αμέριστη βοήθεια και τη συμπαράσταση που μου προσέφεραν, καθώς και στους, Κατερίνα Μαϊδάτση, Χάρη Μπινέλλα, Νάντια Παπαδοπούλου, Σείλια Κολοζώφ και Θωδωρή Χατζημητάκο για την άριστη συνεργασία. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μάμαντο Προδρομίδα και τη Δρ. Αγγελική Φλώρου για την άριστη συνεργασία και τη βοήθεια που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Αθανάσιο Βλεσσίδα, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Πετράκη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Βασίλειο Σακκά.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Απόστολο Αυγερόπουλο για την συνεργασία και την συμβολή του στην εργασία αυτή ειδικότερα στο κομμάτι που αφορά τη φασματοσκοπία διασποράς ενέργειας ακτίνων-Χ και τη μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Χριστίνα Παπαχριστοδούλου για την πολύτιμη βοήθειά της όσο αφορά τη λήψη των περιθλασιγραμμάτων των κεραμικών υλικών, καθώς επίσης και θερμές ευχαριστίες στις κ.κ Λευκοθέα Ντόβα και Λίνα Βασδέκη για τις συμβουλές τους σε ότι αφορούσε το πρόγραμμα «Ηράκλειτος II».

Τέλος, θέλω να εκφράσω την ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, Γεώργιο και Κλεοπάτρα να ευχαριστήσω θερμά τις αδελφές μου Ελευθερία και Βαλεντίνα, για τη συνεχή υποστήριξη και την ηθική συμπαράσταση που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω το σύζυγό μου Γεώργιο Μακρή για τη συνεχή ενθάρρυνση και την ψυχολογική στήριξη που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια καθώς και την κόρη μου Πηνελόπη Μακρή που ήρθε στη ζωή πριν ένα χρόνο και με ολοκλήρωσε ως άνθρωπο.

Αφροδίτη Σφακιανάκη
Ιωάννινα, Οκτώβριος 2015

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	xxiii
----------------------	-------

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1. ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ.....	1
1.1.1. Πορείες βιοσύνθεσης των νουκλεοτιδίων: Σύνθεση de novo και salvage	2
1.1.2. Νουκλεοτίδια στο γάλα	3
1.1.3. Επιτρεπόμενα νουκλεοτίδια και συγκέντρωση αυτών στα εμπορικά σκευάσματα γάλακτος. Ιστορική αναδρομή.....	6
1.2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ.....	8
1.2.1 Χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (Hydrophilic interaction liquid chromatography- HILIC).....	8
1.2.2. Ιστορική αναδρομή.....	10
1.2.3. Μηχανισμός κατακράτησης στη HILIC	10
1.2.4. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της HILIC	13
1.2.5. Υλικά στατικών φάσεων στην HILIC	16
1.2.6. Αναλυτικές εφαρμογές της HILIC	19
1.3. ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ.....	21
1.3.1. Οργανοχλωριωμένες ενώσεις	22
1.3.2. Καρβαμιδικές ενώσεις.....	22
1.3.3. Πυρεθροειδή	22
1.3.4. Ασφυκτικά εντομοκτόνα	22
1.3.5. Οργανοφωσφορικές ενώσεις	23
1.4. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (Gas Chromatography-GC).....	27
1.4.1. Παραγωγοποίηση στην αέρια χρωματογραφία	27
1.5. ΚΕΡΑΜΙΚΑ ΥΛΙΚΑ.....	32
1.5.1. Αλουμίνα	32

1.5.2. Σταννία	32
1.5.3. Πυριτία	32
1.5.4. Τιτανία	33
1.5.5. Ζirkονία.....	33
 1.6. Η ΤΕΧΝΙΚΗ SOL GEL	34
1.6.1. Στάδια της τεχνικής sol-gel	34
1.6.2. Πλεονεκτήματα της τεχνικής sol-gel.....	39
1.6.3. Εφαρμογές της τεχνικής sol-gel	40
1.6.4. Επικάλυψη εκμαγείων με τη τεχνική sol-gel.....	41
1.6.5. Εφαρμογές της τεχνικής sol-gel με τη χρήση εκμαγείων.....	42
 1.7. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	43
1.7.1. Προετοιμασία δειγμάτων.....	45
1.7.1.1. Εκχύλιση στερεής φάσης	45
1.7.1.2. Εκχύλιση με ανάδευση	46
1.7.1.3. Εκχύλιση με χρήση υπερήχων	46
1.7.2. Τεχνικές μικροεκχύλισης.....	47
1.7.2.1. Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SOLID-PHASE MICROEXTRACTION – SPME)	47
1.7.2.2. Μικροεκχύλιση στερεής φάσης βασισμένη σε μεμβράνη (Membrane- based solid-phase microextraction, MSPME).....	48
1.7.2.3. Μικροεκχύλιση στερεής φάσης με ίνες	49
1.7.2.4. Προσροφητική εκχύλιση με κοίλη ίνα (Hollow fiber sorptive extraction-HFSE)	50
 1.8. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΕΡΑΜΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΩΣΦΟΝΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ	52
 1.9. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	56
 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	57
2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΔΙΑΛΥΤΕΣ-ΥΛΙΚΑ	57

2.1.1. Αντιδραστήρια-Διαλύτες.....	57
2.1.2. Υλικά	58
2.2. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ-ΚΙΝΗΤΕΣ ΦΑΣΕΙΣ.....	59
2.2.1. Διαλύματα.....	59
2.2.2. Κινητές φάσεις	59
2.3. ΟΡΓΑΝΑ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ	63
2.4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΤΗΛΕΣ	64
2.4.1. Στήλη διοξο-πυριτία	64
2.4.2. Στήλη αμινο-πυριτία.....	64
2.4.3. Στήλη αμιδο-πυριτία.....	64
2.4.4 Συνθήκες διαχωρισμού και ανίχνευσης με GC-MS	65
2.5. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΚΟΙΛΩΝ ΚΕΡΑΜΙΚΩΝ ΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΛΥΜΑΤΟΣ-ΠΗΚΤΗΣ (SOL-GEL) ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΥΤΩΝ	66
2.5.1 Παρασκευές υδρολυμάτων (sols)	66
2.5.1.1. Παρασκευή υδρολύματος (sol) Al_2O_3	66
2.5.1.2. Παρασκευή υδρολύματος (sol) SnO_2	66
2.5.1.3. Παρασκευή υδρολύματος (sol) TiO_2	66
2.5.1.4. Παρασκευή υδρολύματος (sol) ZrO_2	67
2.5.1.5. Παρασκευή υδρολύματος (sol) SiO_2	67
2.5.1.6. Παρασκευή υδρολύματος (sol) Al_2O_3 - TiO_2	67
2.5.1.7. Παρασκευή υδρολύματος (sol) TiO_2 - ZrO_2	67
2.5.2. Παρασκευή κοίλων κεραμικών ινών.....	67
2.5.3. Χαρακτηρισμός των κεραμικών υλικών	68
2.5.4. Προσδιορισμός του σημείου μηδενικού φορτίου (point of zero charge-pzc) των κοίλων ινών με τη μέθοδο της προσθήκης άλατος.....	68
2.6. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΜΑΤΑΤΩΝ.....	69
2.6.1. Διατήρηση των δειγμάτων.....	69
2.6.2. Επεξεργασία δείγμα γάλακτος.....	69
2.6.2.1. Προετοιμασία δείγματος νουκλεοτιδίων	69
2.6.2.2. Εκχύλιση των νουκλεοτιδίων από γάλα και έκλουση	69

2.6.3. Επεξεργασία υδατικού δείγματος	70
2.6.3.1. Εκχύλιση των φυτοφαρμάκων από νερό λίμνης.....	70
2.6.3.2. Παραγωγοποίηση και εκρόφηση των φυτοφαρμάκων	70
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	71
3.1. ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΟΙΛΩΝ ΚΕΡΑΜΙΚΩΝ ΙΝΩΝ	71
3.1.1. Σύνθεση κοίλων κεραμικών ινών	71
3.1.1.1. Σύνθεση κοίλων κεραμικών ινών	77
3.1.1.2. Αποτέφρωση κοίλων κεραμικών ινών	73
3.1.2. Χαρακτηρισμός κεραμικών υλικών	75
3.1.2.1. Φασματοσκοπία διασποράς ενέργειας ακτίνων-X (Energy-dispersive X-ray spectroscopy-EDX).....	75
3.1.2.2. Περίθλαση ακτίνων X (X-ray diffraction analysis -XRD)	75
3.1.2.2.1. Περίθλασίγραμμα του κεραμικού υλικού αλουμίνας.....	75
3.1.2.2.2. Περίθλασίγραμμα του κεραμικού υλικού τιτανίας	76
3.1.2.2.3. Περίθλασίγραμμα του κεραμικού υλικού ζirkονίας.....	77
3.1.2.2.4. Περίθλασίγραμμα του κεραμικού υλικού σταννίας	78
3.1.2.2.5. Περίθλασίγραμμα του κεραμικού υλικού πυριτίας.....	79
3.1.2.2.6. Περίθλασίγραμμα του κεραμικού υλικού αλουμίνας-σταννίας ..	80
3.1.2.2.7. Περίθλασίγραμμα του κεραμικού υλικού αλουμίνας-τιτανίας ...	80
3.1.2.2.8. Περίθλασίγραμμα του κεραμικού υλικού τιτανίας-ζirkονίας.....	81
3.1.2.3. Μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων (Scanning electron microscopy-SEM).....	82
3.1.3. Προσδιορισμός του σημείου μηδενικού φορτίου (point of zero charge-pzc) ..	84
3.2. ΕΚΛΕΚΤΙΚΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΓΑΛΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΟΙΛΩΝ ΙΝΩΝ ΑΛΟΥΜΙΝΑΣ ΚΑΙ ΣΤΑΝΝΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΜΕ HILIC-DAD	85
3.2.1. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗ HILIC – ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ.....	86
3.2.1.1. Επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης στη στατική φάση	87
3.2.1.1.1. Επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης σε στήλη διολο-πυριτίας.....	87
3.2.1.1.2. Επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης σε στήλη αμινο-πυριτίας.....	91

3.2.1.1.3. Επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης σε στήλη αμιδο- πυριτίας.....	92
3.2.1.2. Επίδραση του pH στην κινητή φάση	95
3.2.1.3. Επίδραση της συγκέντρωσης του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος .99	
3.2.1.4. Επίδραση της φύσης και της συγκέντρωσης του οξέος στην κινητή φάση.....	101
3.2.1.5. Επίδραση της προσθήκης τριαιθυλαμίνης (TEA) στην κινητή φάση (10, 30, 50).....	105
3.2.1.6. Επίδραση της φύσης του οργανικού διαλύτη	106
3.2.1.7. Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης.....	109
3.2.1.8. Επίδραση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης.....	113
3.2.2. ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΕΡΑΜΙΚΕΣ ΙΝΕΣ ΑΛΟΥΜΙΝΑΣ ΚΑΙ ΣΤΑΝΝΙΑΣ- ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ.....	117
3.2.2.1. Επίδραση του pH του διαλύματος των νουκλεοτιδίων.....	117
3.2.2.2. Επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης του διαλύματος των νουκλεοτιδίων παρουσία των ινών.....	119
3.2.2.3. Επίδραση της θερμοκρασίας στην προσυγκέντρωση των νουκλεοτιδίων	120
3.2.2.4. Επίδραση του χρόνου ανάδευσης του διαλύματος των νουκλεοτιδίων στην προσυγκέντρωση	122
3.2.2.5. Επίδραση του όγκου διαλύματος των νουκλεοτιδίων για σταθερή συγκέντρωση αναλυτών.....	124
3.2.2.6. Επίδραση του όγκου του διαλύματος των νουκλεοτιδίων για σταθερή ποσότητα αναλυτών	125
3.2.2.7. Επίδραση του αριθμού των ινών σε διάλυμα των νουκλεοτιδίων για σταθερή ποσότητα αναλυτών	126
3.2.2.8. Συνθήκες έκλουσης των νουκλεοτιδίων από την ίνα αλουμίνας και σταννίας	127
3.2.2.8.1 Επίδραση της σύστασης του διαλύτη έκλουσης	127
3.2.2.8.2. Επιλογή της ποσότητας του όγκου του διαλύτη έκλουσης	132
3.2.2.8.3. Επιλογή του χρόνου έκλουσης των νουκλεοτιδίων από τις ίνες με τη χρήση υπερήχων	133
3.2.3. ΒΕΛΤΙΣΤΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΙΝΕΣ ΑΛΟΥΜΙΝΑΣ ΚΑΙ ΣΤΑΝΝΙΑΣ–ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΕΡΗΣ ΙΝΑΣ.....	135
3.2.4. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	136
3.2.4.1. Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ).....	136

3.2.4.2. Γραμμικότητα (Linearity) και ακρίβεια της μεθόδου (Accuracy).....	136
3.2.4.3. Πιστότητα (Precision).....	137
3.2.4.4. Εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα.....	138
 3.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ GLYPHOSATE, GLUFOSINATE, BIALAPHOS, (1-AMINOPROPYL)PHOSPHONIC ACID ΚΑΙ (1-AMINOBTUTYL) PHOSPHONIC ACID ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΟ ΝΕΡΟ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΜΑΖΑΣ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΛΕΚΤΙΚΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΕ ΚΕΡΑΜΙΚΕΣ ΚΟΙΛΕΣ ΙΝΕΣ.....	141
3.3.1. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗΣ	141
3.3.2. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΕ ΚΕΡΑΜΙΚΕΣ ΚΟΙΛΕΣ ΙΝΕΣ	145
3.3.2.1. pH του διαλύματος των φυτοφαρμάκων.....	145
3.3.2.2. Χρόνος ανάδευσης του διαλύματος των φυτοφαρμάκων.....	150
3.3.2.3. Όγκος του διαλύματος των φυτοφαρμάκων για σταθερή ποσότητα αναλυτών.....	152
3.3.2.3. Όγκος του διαλύματος των φυτοφαρμάκων για σταθερή συγκέντρωση αναλυτών.....	156
3.3.3. ΒΕΛΤΙΣΤΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΑΝΑΛΥΤΩΝ ΣΕ ΙΝΕΣ ΑΛΟΥΜΙΝΑΣ, ΤΙΤΑΝΙΑΣ, ΖΙΡΚΟΝΙΑΣ, ΑΛΟΥΜΙΝΑΣ-ΤΙΤΑΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΙΤΑΝΙΑΣ-ΖΙΡΚΟΝΙΑΣ - ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΕΡΗΣ ΙΝΑΣ.....	161
3.3.4. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	162
3.3.4.1. Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ).....	162
3.3.4.2. Ακρίβεια (Accuracy) και Πιστότητα (Precision).....	162
3.3.4.3. Εφαρμογή σε πραγματικό δείγμα	163
 3.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	165
 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	169
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	211
SUMMARY	213

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

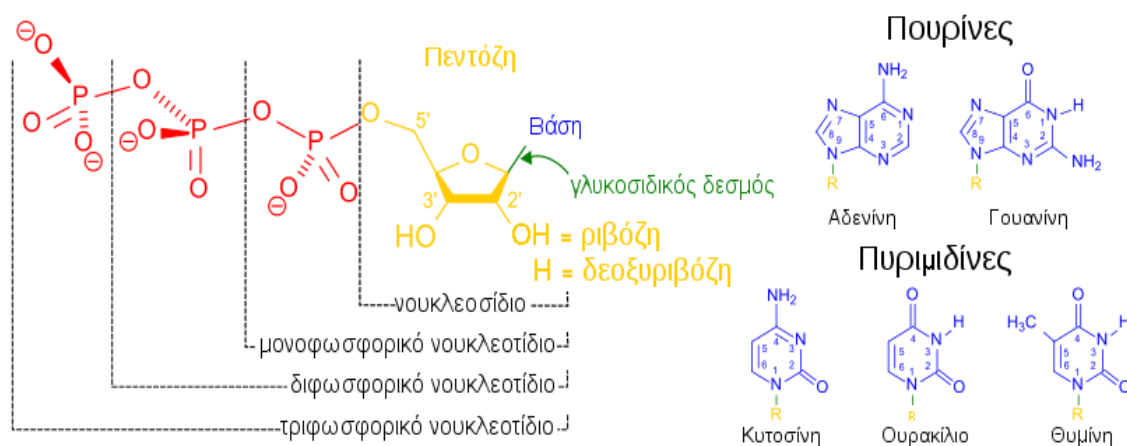
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography / Υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης
RPLC	Reverse phase liquid chromatography / Υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης
NPLC	Normal phase liquid chromatography / Υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
k'	Retention factor / Παράγοντας κατακράτησης
T_f	Tailing factor / Παράγοντας σχετικός με την εμφάνιση «ουράς» μιας κορυφής
ACN	Acetonitrile / Ακετονιτρίλιο
MeOH	Methanol / Μεθανόλη
R_s	Resolution / Διαχωριστική ικανότητα
TFA	Trifluoroacetic acid / Τριφθοροξικό οξύ
TEA	Triethylamine / Τριαιθυλαμίνη
RSD	Relative standard deviation / Σχετική τυπική απόκλιση
DAD	Diode array detector / Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων
UV	Ultraviolet / Υπεριώδες
MS	Mass spectrometry / Φασματομετρία μαζών
v/v	Volume per volume / Όγκος προς όγκο
CMP	Cytidine-5'-monophosphate / Μονοφωσφορική Κυτιδίνη
AMP	Adenosine-5'-monophosphate / Μονοφωσφορική αδενοσίνη
UMP	Uridine-5'-monophosphate / Μονοφωσφορική ουριδίνη
IMP	Inosine-5'-monophosphate / Μονοφωσφορική ινοσίνη
GMP	Guanosine-5'-monophosphate / Μονοφωσφορική γουανοσίνη
GLYP	Glyphosate / N- (φωσφονομέθυλο) γλυκίνη
GLUF	Glufosinate / dl-ομοαλανιν-4-υλ- (μεθυλ) φωσφονικό οξύ
BIAL	Bialaphos / 4- [υδροξυ (μεθυλο) φωσφινυλο] -L-οϋλ-L-αλανυλ-L-αλανίνη
AMPA	(1-aminopropyl)phosphonic acid (ampropylfos) / (RS) -1-αμινοπρόπυλο φωσφονικό οξύ
ABPA	(1-aminobutyl)phosphonic acid / 1- αμινοβουτυλο φωσφονικό οξύ
GC	LC

TFAA	tography / Αέρια χρωματογραφία
TFE	Liquid chromatography / Υγρή χρωματογραφία
Gas	Trifluoroacetic anhydride / Ανυδρίτης Τριφθοροξικού οξέος
chroma	Trifluoroethanol / Τριφθοροαιθανόλη

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

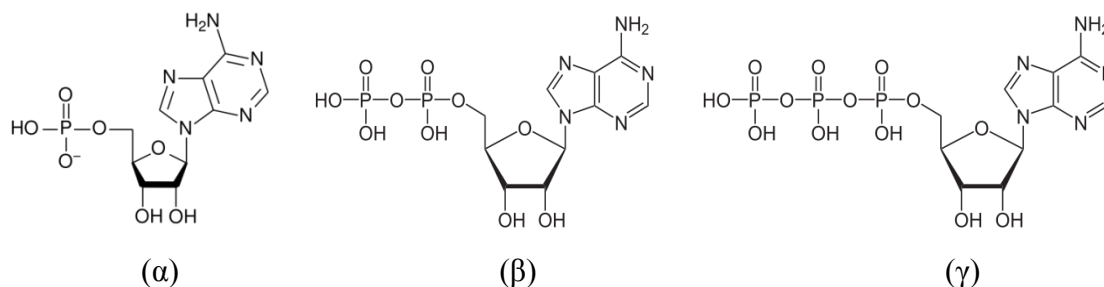
1.1. ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ

Τα νουκλεοτίδια είναι μονομερή και αποτελούν στοιχειώδεις μονάδες των νουκλεϊνικών οξέων (RNA, DNA), τα οποία ελέγχουν την αναπαραγωγή, την ανάπτυξη και τον μεταβολισμό των ζωντανών συστημάτων. Κάθε νουκλεοτίδιο απαρτίζεται από τρεις μονάδες, μία κυκλική αζωτούχα βάση (πυρίνη ή πυριμιδίνη), ένα σάκχαρο με πέντε άτομα άνθρακα (πεντόζη και συγκεκριμένα ριβόζη για το RNA ή δεοξυριβόζη για το DNA) και τουλάχιστον από μία φωσφορική ομάδα (Εικόνα 1.1.1).



Εικόνα 1.1.1. Τα δομικά συστατικά κοινών νουκλεοτιδίων

Έτσι, τα νουκλεοτίδια παίρνουν τις ονομασίες τους ανάλογα με την αζωτούχα βάση και τον αριθμό των φωσφορικών ομάδων που περιέχουν. Σύμφωνα με τα παραπάνω, με βάση την πυρίνη αδείνη και μία, δύο ή τρεις φωσφορικές ομάδες έχουμε τις ονομασίες μονοφωσφορική αδενοσίνη, διφωσφορική αδενοσίνη και τριφωσφορική αδενοσίνη, αντίστοιχα (Εικόνα 1.1.2.):



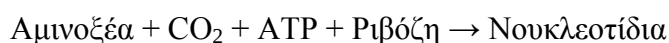
Εικόνα 1.1.2. Χημικές δομές και ονομασίες νουκλεοτιδίων με βάση την αδείνη, (α) μονοφωσφορική αδενοσίνη, (β) διφωσφορική αδενοσίνη, (γ) τριφωσφορική αδενοσίνη

Τα νουκλεοτίδια παίρνουν μέρος σε πολλές βιοχημικές διαδικασίες, ως νουκλεϊνικά οξέα, ως συστατικά συνενζύμων, ως βιολογικοί ρυθμιστές, σε βιοσυνθετικά μονοπάτια και στη μεταφορά χημικής ενέργειας που είναι ουσιαστικές στον κυτταρικό μεταβολισμό [1]:

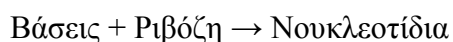
1.1.1. Πορείες βιοσύνθεσης των νουκλεοτιδίων: Σύνθεση de novo και salvage

Τα νουκλεοτίδια και τα νουκλεϊνικά οξέα βρίσκονται σε συνεχή σχηματισμό και αποδόμηση. Ο σχηματισμός τους μπορεί να ακολουθεί μία από τις δύο κύριες πορείες [1-6]:

α. Τα νουκλεοτίδια μπορούν να σχηματιστούν μέσα στα κύτταρα εξ αρχής (σύνθεση de novo), από πρόδρομες ενώσεις αμινοξέων και διοξειδίου του άνθρακα, με διαδοχικές αντιδράσεις:



β. Με τη δεύτερη πορεία (σύνθεση salvage), στην οποία έχουμε τη σύνθεση των νουκλεοτιδίων, που γίνεται μέσω σύνδεσης ενός τμήματος φωσφορικής ριβόζης προς ελεύθερες βάσεις που σχηματίζονται από την υδρολυτική διάσπαση των νουκλεϊνικών οξέων και των νουκλεοτιδίων:



Η δεύτερη πορεία (salvage pathway) είναι ενεργειακά πιο κατάλληλη από ότι οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στην πορεία de novo και ρυθμίζεται από τη διαθεσιμότητα των ελεύθερων βάσεων.

Τα νουκλεοτίδια λαμβάνουν μέρος σε διάφορες διαδικασίες του οργανισμού και είναι απαραίτητη η παρουσία τους στον ανθρώπινο οργανισμό σε τρεις περιπτώσεις: (i) κατά περιόδους όταν η λήψη είναι μη επαρκής, (ii) όταν υπάρχει μεγάλος ρυθμός φυσιολογικής ανάπτυξης και (iii) στην παρουσία ασθένειας. Ένα μόνο μικρό κλάσμα από τα ολικά νουκλεοτίδια μέσω διατροφής λαμβάνονται ως ελεύθερα νουκλεοτίδια. Τα περισσότερα είναι σε μορφή νουκλεοπρωτεϊνών που αποδομούνται ενζυμικά στον εντερικό σωλήνα προς ένα μίγμα νουκλεϊνικών οξέων και διαφόρων συστατικών. Σύμφωνα με τα παραπάνω, υπό ορισμένες συνθήκες, η ανάγκη του σώματος για εξωγενή νουκλεοτίδια μπορεί να αυξηθεί. Παράδειγμα, όταν το σώμα αναπτύσσεται γρήγορα, όπως στα βρέφη.

1.1.2. Νουκλεοτίδια στο γάλα

Η παιδική ηλικία περιλαμβάνει μία περίοδο της ζωής όπου οι θρεπτικές απαιτήσεις είναι οι υψηλότερες. Τα παιδιά πρέπει να συνδυάζουν τροφές για να λαμβάνουν όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται όπως, φρούτα, λαχανικά, κρέας, αυγά και φυσικά γάλα [7]. Η έρευνα στο πεδίο της παιδικής διατροφής καθιέρωσε τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για τα βρέφη, που είναι οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες, οι βιταμίνες, τα λιπαρά οξέα, τα λιπίδια και τα νουκλεοτίδια, τα οποία παίρνουν μέρος στην ανάπτυξη του εγκεφάλου, στην ανάπτυξη της μάθησης, της γλώσσας και της όρασης. Συγκεκριμένα, τα νουκλεοτίδια είναι παρόντα σε τρόφιμα, κυρίως με τη μορφή νουκλεοπρωτεϊνών από τα οποία απομακρύνονται και απορροφούνται αποτελεσματικά [8]. Καθώς τα νουκλεοτίδια είναι οι δομικές μονάδες των νουκλεϊνικών οξέων RNA, DNA και είναι βασικά συστατικά στη μεταφορά ενέργειας των συστημάτων (π.χ. τριφωσφορική αδενοσίνη), τους αποδίδονται λειτουργίες σχετικές με το ανοσολογικό, λιπιδικό και το πεπτικό μεταβολισμό και πολλές φυσιολογικές λειτουργίες των βρεφών [7, 9].

Είναι γενικά γνωστό ότι το μητρικό γάλα είναι η καλύτερη διατροφή για τα βρέφη [5, 10, 11], διότι προσφέρει όλα τα θρεπτικά συστατικά για τη σωστή ανάπτυξη και είναι μία σημαντική προστασία απέναντι στις ασθένειες και στη θνησιμότητα. Αν και το ανθρώπινο γάλα είναι η πρώτη επιλογή για το νεογέννητο, τα υποκατάστατα γάλακτος έχουν ένα απαραίτητο ρόλο στη διατροφή του μωρού, όταν ο θηλασμός δεν είναι εφικτός, επιθυμητός ή επαρκής. Πρόσφατες έρευνες προτείνουν ότι τα διατροφικά νουκλεοτίδια είναι σημαντικά, προκειμένου να διατηρηθεί η φυσιολογική ανάπτυξη στα βρέφη [4, 6, 12].

Το ανθρώπινο γάλα περιέχει περισσότερα νουκλεοτίδια σε σχέση με το γάλα των μηρυκαστικών [11]. Επίσης, η θερμική επεξεργασία του αγελαδινού γάλακτος προκαλεί την αποδόμηση των νουκλεοτιδίων. Για το λόγο αυτό, τα βρέφη που τρέφονται με συμβατικά γάλατα λαμβάνουν λίγα νουκλεοτίδια. Τα εμπορικά σκευάσματα γάλακτος για τα βρέφη είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να προσφέρουν στα βρέφη τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την καλύτερη και βέλτιστη ανάπτυξη και εξέλιξη. Τα νουκλεοτίδια και τα νουκλεοσίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στις βιοχημικές διαδικασίες ιδιαίτερα στις διάφορες φάσεις της ανάπτυξης ενός βρέφους, όπως αναφέρονται παρακάτω [13]:

➤ Απορρόφηση σιδήρου

Ο σίδηρος θεωρείται απαραίτητο θρεπτικό συστατικό για τους ζωικούς οργανισμούς και συμβάλλει στην καλή λειτουργία του οργανισμού. Συγκεκριμένα, συμβάλλει στη μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς, αποτελεί τμήμα διαφόρων ενζύμων που διαδραματίζουν βασικό ρόλο στις διάφορες μεταβολικές πορείες, ενώ επαρκής πρόσληψη σιδήρου είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και για τη σωστή εγκεφαλική λειτουργία σε όλες τις ηλικίες. Ο βαθμός απορρόφησης του σιδήρου επηρεάζεται από τα αποθέματα του σιδήρου στον οργανισμό, την ποσότητα και τη χημική δομή του σιδήρου στην τροφή, καθώς και από μία ποικιλία διατροφικών παραγόντων που αυξάνουν ή μειώνουν την απορρόφησή του [1].

Μελέτη του McMillan και των συνεργατών του [14], έδειξε ότι τα βρέφη που θηλάζουν, απορροφούν περισσότερο από τη διπλάσια ποσότητα σιδήρου από τα βρέφη που τρέφονται με εμπορικά σκευάσματα, παρά το γεγονός ότι το μητρικό γάλα έχει χαμηλότερα ποσοστά σιδήρου από ότι το γάλα του εμπορίου. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι υπάρχει μεγάλη ποσότητα νουκλεοτιδίων στο μητρικό γάλα, σε αντίθεση με τα εμπορικά σκευάσματα τα οποία έχουν έλλειψη αυτών.

➤ Ανάπτυξη

Η διατροφή των μωρών είναι σημαντικός παράγοντας για την σωστή σωματική ανάπτυξη ενός βρέφους. Σύμφωνα με έρευνα σε ποντίκια, η προσθήκη νουκλεοτιδίων στη διατροφή τους είχε ως αποτέλεσμα την βελτίωση του βάρους τους [1, 15]. Στην περίπτωση των ανθρώπινων βρεφών όμως, δεν είναι απόλυτο ότι τα διατροφικά νουκλεοτίδια συμβάλλουν στην ανάπτυξη τους, με την υπόθεση ότι τα de novo νουκλεοτίδια είναι αρκετά. Όμως, στις περιπτώσεις όπου έχουμε μικρή ηλικιακή κύηση, είναι φανερό, σύμφωνα με έρευνες, ότι τα νουκλεοτίδια συμβάλλουν σε υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης (βάρος, ύψος, περιφέρεια κεφαλιού) από ότι θα είχαν τα βρέφη τα οποία δεν θα περιλάμβαναν νουκλεοτίδια στη διατροφή τους [1, 6, 12, 16].

➤ Μεταβολισμός των λιπιδίων

Τα νουκλεοτίδια μέσω διατροφής μπορεί να είναι ρυθμιστές του λιπιδικού μεταβολισμού. Υπάρχουν αρκετές δημοσιευμένες μελέτες [1, 6, 17] που αναφέρονται στις επιδράσεις των νουκλεοτιδίων στο λιποπρωτεϊνικό μεταβολισμό μέσω της διατροφής. Σύμφωνα με έρευνα του Sánchez-Pozo και των συνεργατών του, τα νουκλεοτίδια βοηθούν στην ηπατική ή εντεροκυτταρική σύνθεση λιποπρωτεϊνών σε

ασθενείς και μπορούν να τους προστατεύουν κατά την πρόωμη ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Ακόμα, σύμφωνα με έρευνα του 2004, η προσθήκη νουκλεοτιδίων στα εμπορικά παρασκευάσματα δείχνουν να επηρεάζουν θετικά τα επίπεδα της χοληστερόλης στον ανθρώπινο οργανισμό [18].

➤ Εντερική μικροχλωρίδα

Τα δισχιδοβακτήρια (bifidobacteria), προσφέρουν προστασία στον οργανισμό από εντεροπαθογόνους μικροοργανισμούς. Από κλινικές μελέτες βρέθηκε ότι η ύπαρξη νουκλεοτιδίων στο γάλα ευνοεί την ανάπτυξη αυτών των δισχιδοβακτηρίων, οπότε είναι σημαντική η ύπαρξη των νουκλεοτιδίων στα εμπορικά σκευάσματα του γάλακτος για τα βρέφη [1, 4, 6, 19].

➤ Ανοσοποιητική λειτουργία και σήψη

Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε ζώα και ανθρώπους υποστηρίζουν ότι όταν στο γάλα υπάρχει ποσότητα νουκλεοτιδίων, όπως είναι το μητρικό γάλα, έχουμε εμφάνιση μεγαλύτερης συγκέντρωσης αντισωμάτων, τα οποία βοηθάνε στη βέλτιστη λειτουργία του ανοσολογικού συστήματος, με τη διαδικασία της φαγοκύτωσης [1, 6, 20-26].

➤ Εντερική και ηπατική μορφολογία και λειτουργία

Το έντερο και το ήπαρ ενσωματώνουν, αναλογικά με άλλα όργανα, μεγαλύτερες ποσότητες νουκλεοτιδίων μέσω της διατροφής, εφοδιάζοντας και τροφοδοτώντας την ηπατική και εντερική μορφολογία και λειτουργία [1, 4, 6, 12, 27-30]. Έρευνες σε ποντίκια έδειξαν ότι τα νουκλεοτίδια βοήθησαν στην καλή λειτουργία του ήπατος είτε μετά από τραυματισμό αυτού είτε από μερική ηπατεκτομή [31, 32]. Σε μία έρευνα στη Χιλή που αφορούσε επεισόδια διάρροιας σε βρέφη, παρατηρήθηκε ότι τα νουκλεοτίδια παρέχουν προστασία ενάντια σε μολύνσεις του γαστρεντερικού συστήματος [27]. Επίσης, μία άλλη μελέτη παρατήρησε ότι η ηπατική λειτουργία μετά από βλάβη του ήπατος βελτιώθηκε με παρεντερικά χορηγούμενη ποσότητα νουκλεοτιδίων και νουκλεοσιδίων [29].

➤ Σύνθεση των νουκλεϊνικών οξέων

Φυσικά δεν πρέπει να παραληφθεί ο σπουδαίος ρόλος που έχουν τα νουκλεοτίδια για την σύνθεση των νουκλεϊνικών οξέων. Τα νουκλεοτίδια αποτελούν τις πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση των σημαντικών για τη ζωή νουκλεϊνικών οξέων DNA και RNA.

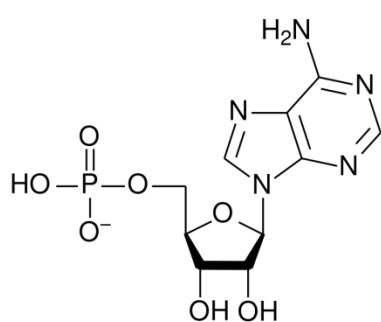
Αυτά, αποτελούνται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες, τα οποία περιέχουν τις γενετικές πληροφορίες που καθορίζουν τη βιολογική ανάπτυξη όλων των κυτταρικών μορφών ζωής.

1.1.3. Επιτρεπόμενα νουκλεοτίδια και συγκέντρωση αυτών στα εμπορικά σκευάσματα γάλακτος. Ιστορική αναδρομή

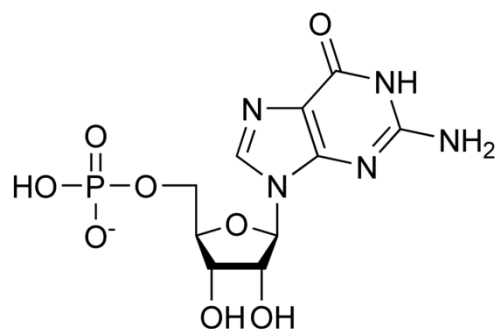
Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα νουκλεοτίδια είναι ευεργετικά για τη καλή λειτουργία του οργανισμού και για το λόγο αυτό πολλές χώρες έχουν εγκρίνει την προσθήκη αυτών στα εμπορικά σκευάσματα για βρέφη, έτσι ώστε να προσεγγίζουν ποιοτικά και ποσοτικά το μητρικό γάλα, όσο αφορά τα νουκλεοτίδια.

Η προσθήκη νουκλεοτιδίων στα εμπορικά σκευάσματα για βρέφη ξεκίνησε από την Ιαπωνία το 1965 ενώ στην Ευρώπη πρώτη τα εισήγαγε η Ισπανία το 1983. Η λήψη νουκλεοτιδίων από βρέφη που τρέφονται με γάλα, στο οποίο έχουν προστεθεί νουκλεοτίδια, υπολογίζεται να είναι της ίδιας τάξης με τη λήψη από το γάλα θηλασμού. Ως πρόσθετα σε βρεφικά σκευάσματα, χρησιμοποιούνται μόνο τα νουκλεοτίδια με τη μορφή μονοφωσφορικών αλάτων. Συνολικά, η μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση είναι 5 mg/100 kcal ή 0,26 mg/g γάλακτος, η οποία αντιστοιχεί περίπου στην ποσότητα των ελεύθερων νουκλεοτιδίων στο μητρικό γάλα. Τα επιτρεπόμενα νουκλεοτίδια που μπορούν να προστεθούν είναι πέντε (Εικόνα 1.1.3): Μονοφωσφορική κυτιδίνη (CMP) 2,5 mg/100 kcal ή 0,13 mg/g γάλακτος, μονοφωσφορική ουριδίνη (UMP) 1,75 mg/100 kcal ή 0,09 mg/g γάλακτος, μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP) 1,5 mg/100 kcal ή 0,08 mg/g γάλακτος, μονοφωσφορική γουανοσίνη (GMP) 0,5 mg/100 kcal ή 0,026 mg/g γάλακτος και μονοφωσφορική ινoσίνη (IMP) 1 mg/100 kcal ή 0,05 mg/g γάλακτος. Ωστόσο, η μέτρηση των επιπέδων των ελεύθερων νουκλεοτιδίων και νουκλεοσιδίων δεν λαμβάνει υπόψη τα πολυμερή νουκλεοτίδια, τις νουκλεοπρωτεΐνες ή τα παράγωγα των νουκλεοτιδίων και νουκλεοσιδίων [1-4, 7, 8, 33]. Έτσι, τα εμπορικά σκευάσματα με νουκλεοτίδια εγκρίθηκαν σε περισσότερες από 30 χώρες, ανάμεσα σε αυτές η Αυστραλία με επιτρεπόμενο όριο τα 16 mg/100 kcal (Food Standards Australia New Zealand (FSANZ), 2006) [217]. Οι Ηνωμένες Πολιτείες (USA Life Sciences Research Office) έχουν δεχτεί την αύξηση της συνολικής ποσότητας των νουκλεοτιδίων σε 16 mg/100 kcal ή 0,83 mg/g γάλακτος. Μάλιστα, όταν το εμπορικό σκεύασμα προορίζεται για πρόωρα βρέφη, τότε η τιμή αυτή αλλάζει σε 22 mg/100 kcal ή 1,13 mg/g γάλακτος [218]. Το 2007, η Επιτροπή Codex Alimentarius Commissions ενέκρινε ένα αναθεωρημένο πρότυπο παρασκευασμάτων για βρέφη, το οποίο παρέχει ένα ρυθμιστικό πλαίσιο που

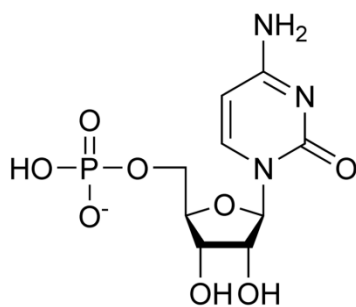
περιλαμβάνει διατάξεις για τη βασική σύνθεσή των εμπορικών σκευασμάτων και αντανακλούν τα επίπεδα θρεπτικών συστατικών στο βρεφικό γάλα [219].



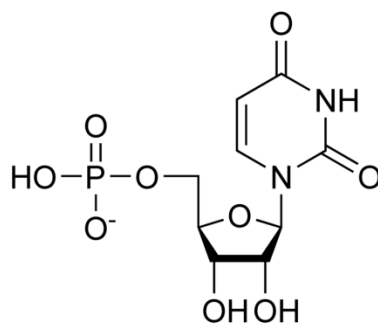
(α)



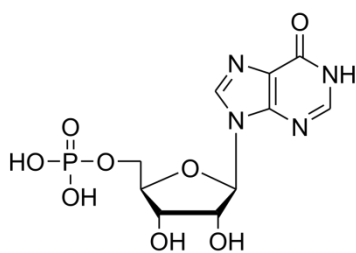
(β)



(γ)



(δ)



(ε)

Εικόνα 1.1.3. Επιτρεπόμενα νουκλεοτίδια που προστίθενται στο γάλα του εμπορίου και η δομή τους. (α) Μονοφωσφορική αδενοσίνη, (β) μονοφωσφορική γουανοσίνη, (γ) μονοφωσφορική κυτιδίνη, (δ) μονοφωσφορική ουριδίνη, (ε) μονοφωσφορική ινοσίνη

1.2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ

Τα νουκλεοτίδια όπως και άλλα βιολογικά μόρια, είναι μη πτητικά και ασταθή και δεδομένης της σημασίας τους στη διατροφή των βρεφών, πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί, κατά τις τελευταίες δεκαετίες, στην ανάπτυξη διαφορετικών μεθόδων για το διαχωρισμό, το χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίησή τους. Μέθοδοι οι οποίες έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό των νουκλεοτιδίων, περιλαμβάνουν τον πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR) [34], την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE) [35, 36], τον ραδιοανοσοπροσδιορισμό [37, 38], τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) [39] και τις ενζυματικές δοκιμασίες (tests) [40]. Ωστόσο, η υψηλή πολικότητα και η ανιονική φύση των νουκλεοτιδίων έχουν καταστήσει την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), ως την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη τεχνική για τον προσδιορισμό των νουκλεοτιδίων σε βιολογικά δείγματα. Έτσι, η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (reversed-phase liquid chromatography), η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (ion-exchange chromatography) ή ζεύγους ιόντων (ion-pairing chromatography) [41-44] και η χρωματογραφία υψηλού pH ανιονανταλλαγής (high-pH anion-exchange chromatography) [45] είναι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των ενώσεων αυτών, εδώ και δεκαετίες. Αν και οι τεχνικές αυτές είναι ευρέως γνωστές, η χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης αποτελεί μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση για το διαχωρισμό των εν λόγω ενώσεων. Μάλιστα, τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί η χρήση της τεχνικής αυτής για την ανάλυση των νουκλεοτιδίων [46-49].

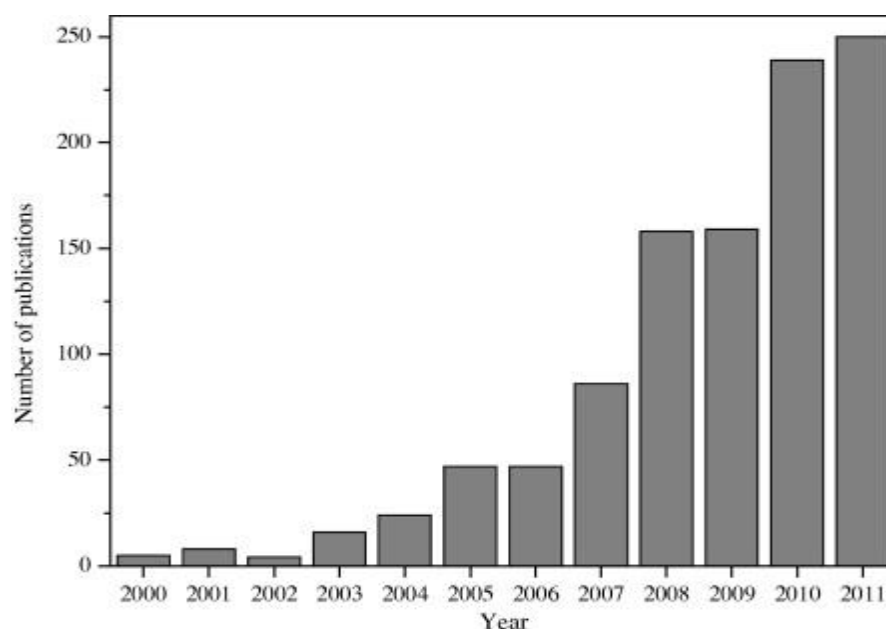
1.2.1 Χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (Hydrophilic interaction liquid chromatography- HILIC)

Η HILIC είναι μία εναλλακτική υγροχρωματογραφική τεχνική για την ανάλυση πολικών ενώσεων. Ο όρος υδρόφιλη αναφέρεται στη σχέση που έχει η μέθοδος αυτή με το νερό. Θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μια διαφοροποίηση της χρωματογραφίας κανονικής φάσης που όμως δεν παρουσιάζει το μειονέκτημα της χρήσης οργανικών διαλυτών μη αναμίξιμων με το νερό [50].

Η HILIC μπορεί να χαρακτηριστεί ως μία τεχνική διαχωρισμού που συνδυάζει στατικές φάσεις, όπως στην υγροχρωματογραφία κανονικής φάσης και κινητές φάσεις που χρησιμοποιεί η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Έτσι, η στατική φάση περιλαμβάνει ένα υδρόφιλο πολικό υλικό, όπως πυριτία ή πυριτία τροποποιημένη με νίτριλο-, αμινο-, διόλο- ομάδες και άλλες πολικές ομάδες. Στις περισσότερες

περιπτώσεις, η κινητή φάση περιέχει υψηλά ποσοστά οργανικού διαλύτη (>80%) με ένα μικρό ποσοστό ενός υδατικού του πλέον πολικού διαλύτη. Άρα στη HILIC, το νερό είναι ο ισχυρός διαλύτης έκλουσης. Η πιο κοινή κινητή φάση στη HILIC περιλαμβάνει ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη με ένα μικρό ποσοστό νερού. Οι ενώσεις που διαχωρίζονται είναι πολικές, υδατοδιαλυτές, με μικρή διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες, όπως το ακετονιτρίλιο. Επίσης, οξέα, βάσεις και άλατα χρησιμοποιούνται συχνά ως πρόσθετα της κινητής φάσης, καθώς επηρεάζουν την κατακράτηση και την εκλεκτικότητα [51, 52]. Ως αποτέλεσμα, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός ενώσεων όπως νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδίων [52], πρωτεϊνών [53], υδατοδιαλυτών βιταμινών [54], σακχάρων [55] αλλά και πολλών ακόμα που σχετίζονται με τη φαρμακευτική χημεία, τη μοριακή βιολογία κ.α.

Από το 1990, οπότε και αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Alpert ο όρος HILIC, έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον για την τεχνική αυτή [56]. Η ραγδαία αύξηση της χρήσης της τεχνικής ξεκίνησε τα τελευταία δέκα χρόνια και τουλάχιστον 26 άρθρα ανασκόπησης έχουν δημοσιευθεί με αντικείμενο την HILIC [50, 51, 57]. Οι αυξημένες εφαρμογές της HILIC φαίνονται από την αύξηση των ερευνητικών δημοσιεύσεων και δείχνει ότι αυτή η τεχνική διαχωρισμού υιοθετείται όλο και περισσότερο από τους ερευνητές, ιδιαίτερα από το τέλος της δεκαετίας του 2000 και έπειτα (Εικόνα 1.2.1.).



Εικόνα 1.2.1. Αριθμός δημοσιεύσεων που εμφανίζονται στις επιστημονικές βάσεις δεδομένων με τους όρους "HILIC" και "χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης" 2000- 2011.

1.2.2. Ιστορική αναδρομή

Το 1990 ο Alpert πρότεινε τον όρο "HILIC" για να περιγράψει το διαχωρισμό πολικών ενώσεων όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, πεπτίδια, αμινοξέα και νουκλεοτίδια, χρησιμοποιώντας υδατο-οργανική κινητή φάση. Ωστόσο, η HILIC είχε χρησιμοποιηθεί ακόμη παλαιότερα, το 1951, από τον Gregor και τους συνεργάτες του [58], το 1952 από τους Samuelson και Sjöström [59], το 1954 από τους Rückert και Samuelson [60] και το 1975 από τους Linden και Lawhead [61] αλλά και από τον Palmer [62], οι οποίοι είχαν κάνει χρήση της HILIC ως μέθοδο διαχωρισμού. Η HILIC είχε επίσης χρησιμοποιηθεί από τους Havlicek και Samuelson το 1975 [220] και από τον Lampert και τους συνεργάτες του το 1989 [221] ενώ ο Rabel και οι συνεργάτες του παρατήρησαν για πρώτη φορά ότι η τεχνική αυτή είναι μια παραλλαγή της χρωματογραφίας κανονικής φάσης [222]. Τέλος, ο Alpert μελέτησε τη στήλη πυριτίας επικαλυμμένης με ένα οργανικό πολυμερικό ιονανταλλάκτη και ένα ουδέτερο πολυμερές επικαλυμμένο για τον διαχωρισμό των αμινοξέων και των πεπτιδίων. Η μελέτη αυτή επιβεβαίωσε ότι εκτός από την στήλη πυριτίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες στατικές φάσεις στη HILIC, όλες όμως πρέπει να έχουν πολικό χαρακτήρα.

1.2.3. Μηχανισμός κατακράτησης στη HILIC

Οι ενώσεις που μπορούν να διαχωριστούν εφαρμόζοντας την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης περιλαμβάνουν από πολύ υδρόφοβα μόρια, όπως τα καροτενοειδή που διαχωρίζονται με την υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης (reverse-phase liquid chromatography-RPLC) έως πολύ υδρόφιλα, όπως οι υδατάνθρακες, αμινοξέα, που διαχωρίζονται με την τεχνική της χρωματογραφίας κανονικής φάσης (normal-phase liquid chromatography-NPLC). Όπως αναφέρθηκε ήδη, ο Alpert (1990) ανέδειξε τη HILIC ως μια σπουδαία και ισχυρή εναλλακτική τεχνική για το διαχωρισμό πολικών ενώσεων. Σύμφωνα με τον Alpert, οι προς ανάλυση ενώσεις αλληλεπιδρούν με την υδρόφιλη στατική φάση και εκλύονται με μια σχετικά υδρόφοβη κινητή φάση (π.χ. αποτελούμενη από μίγμα ACN και H₂O). Ακόμα, ο όρος HILIC θα πρέπει να χρησιμοποιείται όταν α) ο ισχυρός διαλύτης έκλυσης είναι το ύδωρ και β) ο μηχανισμός κατακράτησης λαμβάνει χώρα μέσω κατανομής. Ο Alpert πρότεινε ότι ο μηχανισμός κατακράτησης στην HILIC περιλαμβάνει την κατανομή μιας ένωσης μεταξύ του μεγαλύτερου όγκου της κινητής φάσης και μιας στιβάδας αποτελούμενης στο μεγαλύτερο ποσοστό από ύδωρ, μερικώς ακινητοποιημένης στην επιφάνεια της στατικής φάσης.

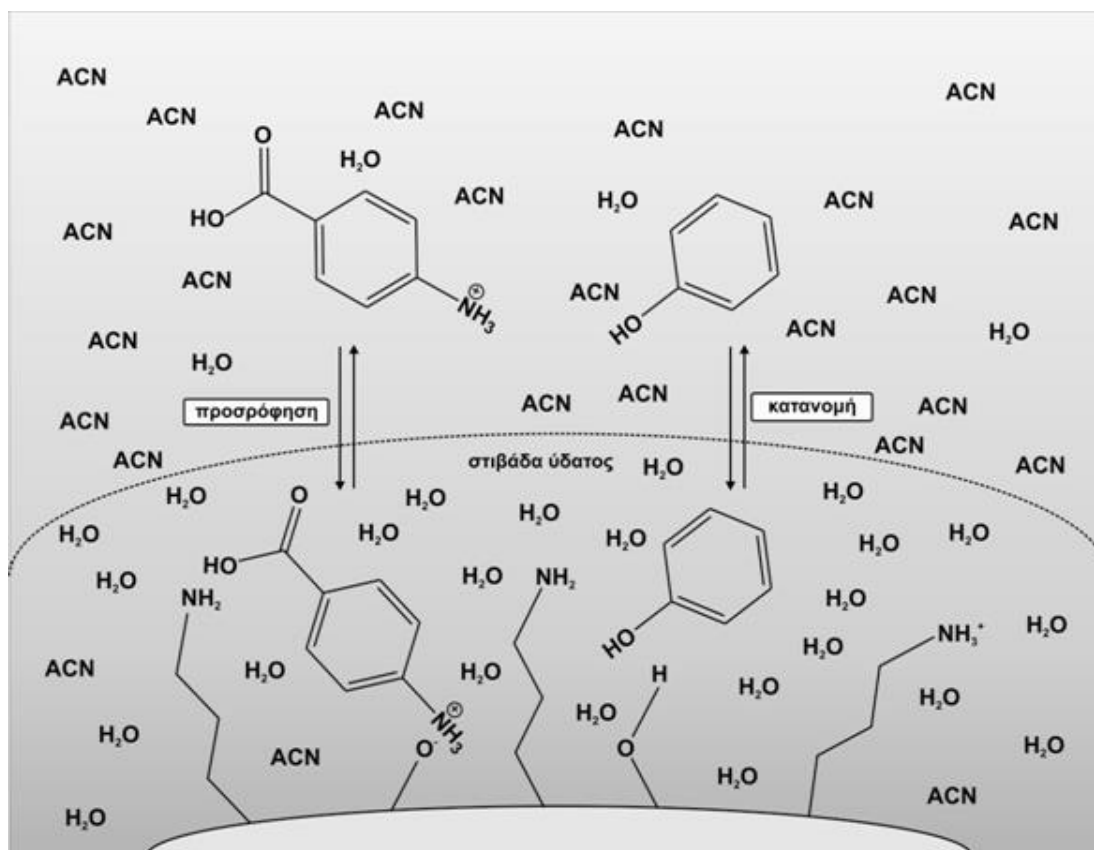
Τα επιχειρήματα για τον μηχανισμό κατανομής προέκυψαν από πειράματα κατακράτησης και διαχωρισμού υδατανθράκων που πραγματοποιήθηκαν από τους Verhaar και Kuster [63], Orth και Engelhardt [64] και Nikolov και Reilly [65] παρουσία ύδατος στην κινητή φάση και με τη χρήση στηλών από μη επικαλυμμένη πυριτία και πυριτία επικαλυμμένη με αμινομάδες. Τα πειράματα αυτά απέδειξαν τη συνεισφορά της κατανομής στο μηχανισμό κατακράτησης, αφού οι στατικές φάσεις έχουν τη δυνατότητα συγκράτησης μέρους της κινητής φάσης με μεγάλη περιεκτικότητα σε ύδωρ, υπό τη μορφή στιβάδας. Από τις μελέτες αυτές προέκυψε ότι: α) η αύξηση του χρόνου κατακράτησης είναι ανάλογη με την αύξηση του μεγέθους των μορίων και β) οι χρόνοι κατακράτησης των μορίων επηρεάζονται σημαντικά από τη μεταβολή της ιοντικής ισχύος στην κινητή φάση.

Η ιδέα της ύπαρξης μιας “ακίνητοποιημένης” στιβάδας ύδατος έχει λάβει ευρεία αποδοχή. Για το λόγο αυτό, ο μηχανισμός κατανομής υγρού-υγρού αποκτά όλο και μεγαλύτερη αποδοχή. Η ύπαρξη μιας στιβάδας με μεγάλη περιεκτικότητα σε ύδωρ στην επιφάνεια μιας πολικής στατικής φάσης, αναδεικνύει το ρόλο του ύδατος στο μηχανισμό κατακράτησης, σε στατικές φάσεις με βάση την πυριτία. Εξετάζοντας το φαινόμενο από μια διαφορετική οπτική γωνία, μπορεί να ειπωθεί ότι η στιβάδα ύδατος είναι δυναμικά ακίνητοποιημένη στην επιφάνεια μιας στατικής φάσης, γεγονός το οποίο είναι πολύ διαφορετικό από τη μόνιμη πρόσδεση, μέσω χημικού δεσμού, όπως είναι για παράδειγμα οι αλυσίδες άνθρακα σε μια στήλη αντίστροφης φάσης. Ο Alpert σε μια πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι: «ένα μοντέλο για το μηχανισμό κατακράτησης υποδεικνύει την κατανομή μιας ένωσης μεταξύ της κινητής φάσης και μιας αργά κινούμενης στιβάδας ύδατος, με την οποία η στατική φάση είναι ενυδατωμένη» [66]. Από την άλλη πλευρά, η υδατική στιβάδα δεν δημιουργείται σε μια αδρανή στατική φάση. Έτσι, τα μόρια του ύδατος δεν μπορούν να αποτρέψουν από την αλληλεπίδραση με τους αναλύτες το σύνολο των δομικών ομάδων μιας πολικής στατικής φάσης, όπως οι σιλανομάδες, οι αμινομάδες κ.α.. Κατά συνέπεια, πολικές ενώσεις σχετικά μικρού μοριακού βάρους θα μπορούσαν εύκολα να διεισδύσουν στην υδατική στιβάδα και να αλληλεπιδράσουν απευθείας με τις δομικές ομάδες της επιφάνειας της στήλης.

Άλλες μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός μηχανισμού στον οποίο, πιθανό, να λαμβάνουν χώρα υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου ή ιόντος-διπόλου [67-72] και αφορά σε αναλύτες με περισσότερες από μία λειτουργικές

ομάδες στις χημικές δομές τους. Η άποψη αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι οι πολικές ομάδες που συνδέονται με τα διάφορα είδη των στατικών φάσεων προσελκύουν τα μόρια του νερού, σχηματίζοντας μία υδατική στιβάδα πάνω από την επιφάνεια. Έτσι, ένας πολικός αναλύτης που είναι ευδιάλυτος στην κινητή φάση υφίσταται κατανομή μεταξύ των δύο υδατικών φάσεων: την ημιακινητοποιημένη υδατική στιβάδα και την κινητή φάση, που έχει επίσης ένα μικρό ποσοστό σε υδατικό περιεχόμενο. Οι πολικοί αναλύτες έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με την ακινητοποιημένη ημι-υδατική στιβάδα από ότι με την, κατά κύριο λόγο, οργανική κινητή φάση, δεδομένου ότι έχουν καλύτερη διαλυτότητα στην πρώτη. Αυτή η προτίμηση, οδηγεί σε αυξημένη αλληλεπίδραση του αναλύτη με την υδατική στιβάδα, αυξάνοντας την κατακράτηση. Στην Εικόνα 1.2.2. απεικονίζεται ένας τέτοιος μηχανισμός κατά τον οποίο λαμβάνει χώρα κατανομή και επιφανειακή προσρόφηση ανάλογα με τις ιδιότητες των ενώσεων και της στατικής φάσης [73].

Τέλος, ο μηχανισμός κατακράτησης στη HILIC εξαρτάται όχι μόνο από τη στατική φάση, αλλά και από τη χημική φύση του αναλύτη και από την σύνθεση της κινητής φάσης. Ο Καραταπάνης [54] στην εργασία του, διαχωρίζει κάποιες υδατοδιαλυτές βιταμίνες και αποδεικνύει ότι υπάρχει μια μεταβατική περίοδος από τον μηχανισμό κατανομής στον μηχανισμό προσρόφησης, όταν το ποσοστό του οργανικού διαλύτη στη σύνθεση της κινητής φάσης αυξάνεται. Ανεξαρτήτως των παραπάνω υποθέσεων, η αποσαφήνιση του μηχανισμού κατακράτησης στην HILIC είναι υπό συνεχή διερεύνηση [63-65, 74, 75].



Εικόνα 1.2.2. Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μηχανισμού κατακράτησης στην HILIC

1.2.4. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της HILIC

Πολλά είναι τα πλεονεκτήματα της HILIC που την καθιστούν μία εναλλακτική ή συμπληρωματική τεχνική των NPLC και RPLC. Ο μηχανισμός διαχωρισμού που παρατηρείται στην HILIC μειώνει τα προβλήματα της μη αντιστρέψιμης κατακράτησης και ασυμμετρίας των κορυφών, που εμφανίζονται κατά τη χρήση της NPLC. Η προετοιμασία της κινητής φάσης είναι πιο απλή διότι απουσία απολικών διαλυτών δεν απαιτείται έλεγχος ως προς το περιεχόμενο ύδωρ και αποφεύγονται προβλήματα σχετικά με την ομοιογένεια της κινητής φάσης. Επιπλέον, η παρουσία απολικών διαλυτών στην NPLC (συχνά η κινητή φάση παρασκευάζεται με βάση το εξάνιο) δυσχεραίνει τη διαλυτότητα των πολικών ενώσεων.

Ένα από τα πολλά πλεονεκτήματα της HILIC είναι η ικανότητά της να διαχωρίζει πολικές και ιοντικές ομάδες οι οποίες είναι δύσκολο να διαχωριστούν με την RPLC. Στην RPLC κάποιες ενώσεις έχουν μικρή κατακράτηση και πολλοί πολικοί αναλύτες έκλουσης εκλούνται στο νεκρό όγκο της στήλης. Ακόμα, οι πολικοί αναλύτες κατακρατούνται πιο ισχυρά στη HILIC σε σχέση με την RPLC,

κάτι το οποίο είναι πολύ σημαντικό για την ανάλυση εκχυλισμάτων και δειγμάτων από βιολογικές μήτρες. Η σειρά έκλουσης στην HILIC είναι περίπου αντίθετη από αυτήν που ισχύει στην RPLC, γεγονός που σημαίνει ότι η HILIC είναι αποτελεσματική για το διαχωρισμό ενώσεων που έχουν προβληματική συμπεριφορά στη RPLC. Από τη συμπληρωματική εκλεκτικότητα μεταξύ HILIC και RPLC προκύπτει ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα που αφορά τη δυνατότητα συνδυασμού με τεχνικές απομόνωσης και καθαρισμού δειγμάτων. Όταν η HILIC χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (RP-SPE), ο ισχυρός διαλύτης έκλουσης (οργανικός) που χρησιμοποιείται για την εκρόφιση των ενώσεων από τη συσκευή SPE, αποτελεί τον ασθενή διαλύτη έκλουσης στην HILIC. Επιπλέον, η εκχύλιση υγρού-υγρού ή ακόμα και η καταβύθιση πρωτεϊνών σε ένα δείγμα γίνεται συνήθως με τη χρήση ενός οργανικού διαλύτη. Κατά συνέπεια, είναι δυνατή η απευθείας έγχυση του εκλούσματος εκχύλισης στο σύστημα της HPLC, γεγονός το οποίο ελαττώνει σημαντικά το χρόνο κατεργασίας πριν την ανάλυση (π.χ. εξάτμιση και επαναδιαλυτοποίηση) καθώς και τις πιθανές απώλειες συστατικών κατά τη διάρκεια μιας πειραματικής πορείας [76]. Εντούτοις, η προσέγγιση αυτή είναι εφικτή σε περιπτώσεις που οι προς ανάλυση ενώσεις εμφανίζουν κατακράτηση σε στατικές φάσεις τόσο της RPLC όσο και της HILIC. Η συμπληρωματική εκλεκτικότητα της HILIC ως προς την RPLC καθιστά επίσης δυνατή την ανάπτυξη διαχωρισμών δύο διαστάσεων (δι-διάστατη υγρή-υγρή χρωματογραφία) καθώς και στις δύο τεχνικές χρησιμοποιούνται υδατο-οργανικές κινητές φάσεις, γεγονός το οποίο λειτουργεί ευνοϊκά στη μεταφορά κλασμάτων κινητής φάσης μεταξύ των δύο στατικών φάσεων [77]. Επιπλέον, η HILIC αποτελεί μια εναλλακτική τεχνική διαχωρισμού βασικών ενώσεων. Ως γνωστό, οι οργανικές βάσεις αποτελούν μια ιδιαίτερα προβληματική κατηγορία ενώσεων στην RPLC αφενός λόγω της μικρής κατακράτησης και αφετέρου λόγω της λήψης ασύμμετρων χρωματογραφικών κορυφών.

Στην HILIC, η παρουσία οργανικού διαλύτη σε υψηλά ποσοστά (συνήθως 60-95%, v/v), ελαττώνει σημαντικά το ιξώδες της κινητής φάσης με αποτέλεσμα η πίεση που αναπτύσσεται στη στήλη να είναι πολύ χαμηλότερη από αυτή στην RPLC. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένα επιπλέον σημαντικό πλεονέκτημα αφού λόγω των οργανικών διαλυτών επιτρέπεται να γίνεται ο διαχωρισμός σε χαμηλότερες πιέσεις από ότι στην RPLC, δηλαδή είναι δυνατή η εφαρμογή υψηλών ροών κινητής φάσης και κατά συνέπεια η ελάττωση του χρόνου ανάλυσης [70, 78]. Θα πρέπει όμως να

σημειωθεί ότι η αύξηση της ροής της κινητής φάσης είναι ευνοϊκή μέχρι το σημείο που δεν λαμβάνει χώρα σημαντική μείωση της απόδοσης της χρωματογραφικής στήλης. Ένα ακόμα πλεονέκτημα που προκύπτει από την υψηλή περιεκτικότητα της κινητής φάσης σε οργανικό διαλύτη είναι η μεγαλύτερη ευαισθησία κατά το συνδυασμό της HILIC με μεθόδους ανίχνευσης, όπως είναι ο ανιχνευτής μάζας και ο ανιχνευτής σκεδασμού φωτός, λόγω της υψηλής πτητικότητας της κινητής φάσης. Η HILIC δεν απαιτεί προσαρμογές στον εξοπλισμό που χρησιμοποιείται για τους διαχωρισμούς στις RPLC και NPLC καθώς χρησιμοποιεί στατικές και κινητές φάσεις κοινές. Έτσι, το κόστος συντήρησης είναι παρόμοιο με αυτό που έχουν οι RPLC and NPLC.

Η HILIC, εκτός από πλεονεκτήματα έναντι άλλων τεχνικών διαχωρισμού, παρουσιάζει επίσης περιορισμούς και μειονεκτήματα. Ο μηχανισμός διαχωρισμού στην HILIC είναι λιγότερο κατανοητός από ότι στην RPLC, κάτι το οποίο κάνει δύσκολη την πρόβλεψη των αλλαγών στις συνθήκες διαχωρισμού. Επίσης, η HILIC δεν είναι κατάλληλη να χρησιμοποιηθεί για υδρόφοβες ενώσεις, διότι αυτές δεν παρουσιάζουν ικανοποιητικές αλληλεπιδράσεις για να γίνει ένας καλός διαχωρισμός, όπως στην RPLC. Ένας σημαντικός περιορισμός της τεχνικής προκύπτει από τη μειωμένη διαλυτότητα των αλάτων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων, λόγω της παρουσίας οργανικού διαλύτη (π.χ. ACN) σε υψηλά ποσοστά [67]. Στα μειονεκτήματα της HILIC συγκαταλέγονται και οι μεγάλοι χρόνοι εξισορρόπησης της στήλης, κυρίως στη βαθμιδωτή έκλυση. Σε σύγκριση με την RPLC, όπου ο χρόνος εξισορρόπησης της στήλης κυμαίνεται από 15 έως 20 min, ο χρόνος εξισορρόπησης στην HILIC συνήθως κυμαίνεται από 45 έως 60 min [79]. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που οι χρόνοι εξισορρόπησης είναι μεγαλύτεροι της μιας ώρας, γεγονός το οποίο εξαρτάται από το χρησιμοποιούμενο άλας στην κινητή φάση και από τη φύση της ίδιας της στατικής φάσης. Το μειονέκτημα αυτό μπορεί να αντισταθμιστεί, έως ένα βαθμό, με τη δυνατότητα εφαρμογής υψηλών ροών λόγω του χαμηλού ιξώδους της κινητής φάσης με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του χρόνου εξισορρόπησης [70].

Ένα άλλο μειονέκτημα είναι η πολύ ισχυρή κατακράτηση ή ακόμα και η μη αντιστρεπτή προσρόφηση ενώσεων που εμφανίζουν μεγάλη χημική συγγένεια με τη στατική φάση. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται τόσο σε βασικές ενώσεις, οι οποίες κατακρατούνται ισχυρά από την αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια μιας στατικής φάσης (π.χ. ομάδες σιλανόλης) μέσω ισχυρών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων,

όσο και σε όξινες ενώσεις με τη χρήση στηλών που φέρουν θετικά φορτισμένες ομάδες (π.χ. αμινομάδες). Μειονέκτημα επίσης αποτελεί η ευαισθησία ορισμένων στατικών φάσεων, με βάση την πυριτία, σε μεγάλες περιεκτικότητες ύδατος στην κινητή φάση. Συγκεκριμένα, υπάρχουν στατικές φάσεις με βάση την πυριτία, όπως η αμινο-πυριτία και σε μικρότερο βαθμό η διόλη-πυριτία, στις οποίες παρατηρείται αποκόλληση υλικού (column bleeding) παρουσία ύδατος σε ποσοστό 30-50% (v/v) με αποτέλεσμα τη βαθμιαία μείωση της απόδοσης της στήλης. Το φαινόμενο αυτό αφενός μειώνει σημαντικά το χρόνο ζωής της στήλης και αφετέρου δυσχεραίνει τη χρήση γενικών ανιχνευτών (πχ. ανιχνευτής μάζας και ανιχνευτής σκεδάσης φωτός) λόγω αυξημένου θορύβου ή εμφάνισης επιπλέον χρωματογραφικών κορυφών πέραν των αναλυόμενων συστατικών. Τέλος, η HILIC είναι μια τεχνική διαχωρισμού λιγότερο “φιλική” προς το περιβάλλον, σε σύγκριση με την RPLC, λόγω της κατανάλωσης μεγαλύτερων όγκων οργανικού διαλύτη [77]. Όμως, συγκρινόμενη με την NPLC, η HILIC εμφανίζεται καταλληλότερη καθώς αποφεύγει τη χρήση μεγάλων όγκων τοξικών οργανικών διαλυτών.

1.2.5. Υλικά στατικών φάσεων στην HILIC

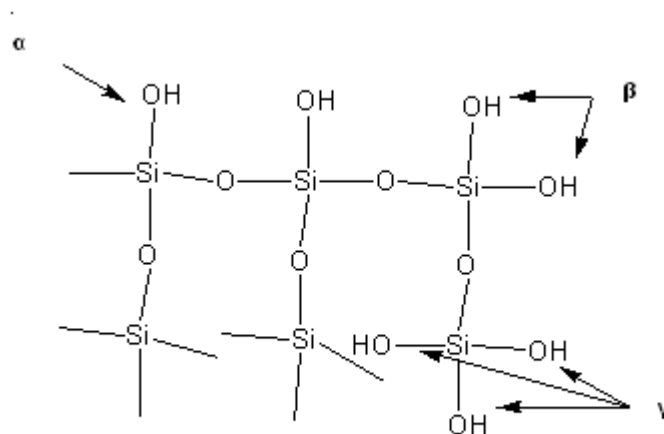
Παράλληλα με την ευρεία εφαρμογή στη διεθνή βιβλιογραφία της HILIC, έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον και για την ανάπτυξη χρωματογραφικών υλικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά με την τεχνική αυτή. Η περιγραφή των χρωματογραφικών στηλών ξεκινάει από τα ανόργανα τροποποιημένα υλικά και συγκεκριμένα από τη μη επικαλυμμένη πυριτία και καταλήγει σε πυριτία, στην οποία έχουν συνδεθεί χημικές ομάδες ως υλικό πρόσδεσης. Παρακάτω αναφέρονται πέντε βασικοί τύποι στηλών.

➤ Μη επικαλυμμένη πυριτία

Η πυριτία με την οποία είναι πληρωμένη μία χρωματογραφική στήλη βρίσκεται υπό μορφή ξηροπηκτώματος (xerogel) αποτελούμενο από μικρούς κόκκους διαμέτρου μερικών μικρομέτρων. Το σύνολο των κόκκων αποτελούν με τη σειρά τους τα πρωτογενή σωματίδια της πυριτίας με διάμετρο λίγων Å. Τα σωματίδια αυτά συνενώνονται μέσω συμπύκνωσης κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του ξηροπηκτώματος. Η επιφάνεια των πρωτογενών σωματιδίων της πυριτίας είναι αυτή στην οποία οφείλεται η αλληλεπίδραση και συνεπώς, η κατακράτηση των ενώσεων σε διάφορες τεχνικές της υγρής χρωματογραφίας συμπεριλαμβανομένης και της HILIC. Το υλικό της

πρωτογενούς πυριτίας αποτελείται από έναν πυρήνα (core) ατόμων πυριτίου ενωμένων μεταξύ τους υπό τη μορφή σιλοξανίων (Εικόνα 1.2.3.). Εντούτοις, στην επιφάνεια του υλικού αυτού υπάρχει ένας αριθμός υπολειμματικών υδροξυλομάδων, που δεν έχουν συμπυκνωθεί και προέρχονται από υπολείμματα του πυριτικού οξέος ($\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$). Οι υπολειμματικές ή αλλιώς "ελεύθερες" υδροξυλομάδες προσδίδουν στην επιφάνεια της πυριτίας τον πολικό χαρακτήρα και είναι οι ομάδες που αντιδρούν με διάφορα αντιδραστήρια σιλανοποίησης προς σχηματισμό προσδεδεμένων στατικών φάσεων [80].

Οι ομάδες σιλανόλης στην επιφάνεια της πυριτίας κατέχουν σημαντικό ρόλο στην κατακράτηση υπό συνθήκες HILIC. Όταν για παράδειγμα σε μία χρωματογραφική στήλη χρησιμοποιείται πυριτία διαφορετικού τύπου (πυριτία τύπου-A και τύπου-B), τόσο ο παράγοντας κατακράτησης όσο και η εκλεκτικότητα των ενώσεων μπορεί να είναι πολύ διαφορετική [81].

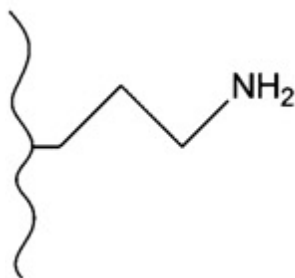


Εικόνα 1.2.3. Απεικόνιση της επιφάνειας της πυριτίας και των υδροξυλομάδων διαφορετικού τύπου, οι οποίες είναι: α) απλές (μία υδροξυλομάδα συνδεδεμένη σε ένα άτομο πυριτίου), β) διπλές (δύο υδροξυλομάδες συνδεδεμένες στο ίδιο άτομο πυριτίου), γ) τριπλές (τρεις υδροξυλομάδες συνδεδεμένες στο ίδιο άτομο πυριτίου)

➤ Αμινο-πυριτία

Η πυριτία με ομάδες προπυλαμίνης ως υλικό πρόσδεσης (Εικόνα 1.2.4.) ήταν η πρώτη προσδεδεμένη στατική φάση που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό υδατανθράκων σε συνθήκες HILIC. Το πλεονέκτημα της στατικής αυτής φάσης σε σχέση με τη μη επικαλυμμένη πυριτία είναι ότι αυξάνει το ρυθμό πολυστροφισμού με αποτέλεσμα την αποφυγή εμφάνισης διπλών κορυφών [75]. Η στήλη της αμινο-πυριτίας

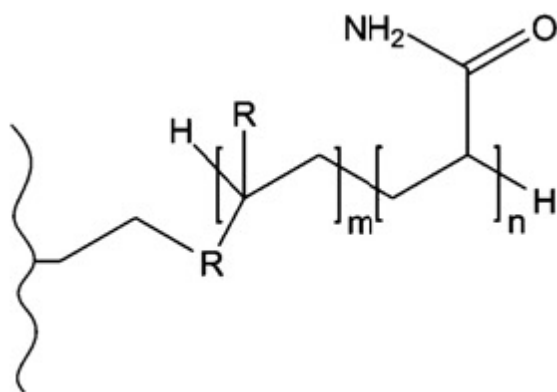
χρησιμοποιείται συχνά στη HILIC για τον διαχωρισμό σακχάρων, αμινοξέων, πεπτιδίων, καρβοξυλικών οξέων και νουκλεοσιδίων [69].



Εικόνα 1.2.4. Απεικόνιση της στατικής φάσης της αμινο-πυριτία

➤ Αμιδο-πυριτία

Η αμιδο-πυριτία (Εικόνα 1.2.5.) περιέχει στην επιφάνειά της καρβαμυλο- ή άμιδο- ομάδες προσκολλημένες σε μικρές αλειφατικές αλυσίδες. Χρησιμοποιείται κυρίως για τον διαχωρισμό των πεπτιδίων. Τα υδρόφιλα πεπτίδια κατακρατούνται ισχυρότερα στη στατική φάση αμιδο-πυριτίας απ' ό,τι τα υδρόφοβα πεπτίδια. Η αμιδο-πυριτία στη HILIC είναι ικανοποιητική για το διαχωρισμό και άλλων υδρόφιλων ή αμφίφιλων πολυμερών μορίων, όπως ολιγοσακχαρίτες, γλυκοπρωτεΐνες ή διάφορα γλυκοσίδια [57].

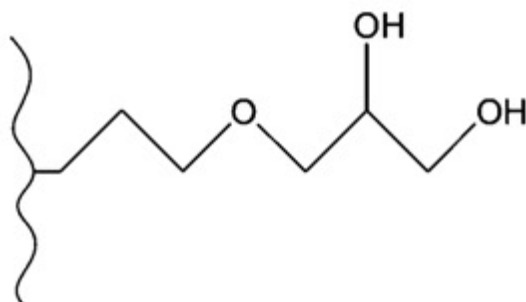


Εικόνα 1.2.5. Απεικόνιση της στατικής φάσης αμιδο-πυριτία (TSK-Gel Amide-80)

➤ Διόλη-πυριτία

Η διόλη-πυριτία (Εικόνα 1.2.6.) πλησιάζει σε μεγάλο βαθμό τη συνολική πολικότητα της μη επικαλυμμένης πυριτίας. Παρασκευάζεται με αντίδραση της πυριτίας με αλκοξυγλυκιδοξυπροπολυοσιλάνιο και σχηματίζεται ο υποκαταστάτης 2,3-

διυδροξυπροπυλο- ο οποίος είναι χημικά συνδεδεμένος με σιλοξάνιο. Η στήλη διόλη-πυριτία έχει χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με την HILIC αλλά πρόσφατα χρησιμοποιήθηκε και για τον διαχωρισμό ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους, όπως φαινόλες, βιταμίνες και σάκχαρα [54, 55, 82].



Εικόνα 1.2.6. Απεικόνιση της στατικής φάσης διολη-πυριτία

➤ Αμφολυτική (Zwitterionic)

Οι αμφολυτικές στατικές φάσεις εμφανίστηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 1980 και αρχικά είχαν εφαρμογή στην ιοντική χρωματογραφία. Αποτελούνται από μικρές αλυσίδες άνθρακα με ομάδες που είναι φορτισμένες θετικά ή αρνητικά, συνδεδεμένες σε υπόστρωμα πυριτίας ή πολυμερούς [51]. Αυτός ο τύπος στατικής φάσης έχει εφαρμογές σε διαχωρισμούς έως σήμερα και φυσικά έχει καλή εφαρμογή και στην HILIC [83-85]. Πιο συγκεκριμένα, οι στήλες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό πολικών ενώσεων [86], μεταβολιτών [87], γλυκοζινολυτών (glucosinolates) [88], αμινογλυκοζίτες (aminoglycosides) [89], γλυκοπεπτιδίων [90] και άλλων ενώσεων.

1.2.6. Αναλυτικές εφαρμογές της HILIC

Ο Πίνακας 1 συνοψίζει πληροφορίες από επιλεγμένες μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει την HILIC. Κοινός παρονομαστής αυτών των μελετών είναι η πολυπλοκότητα της μήτρας από την οποία προέρχονται (π.χ., αίμα, ούρα, περιβαλλοντικά δείγματα και τρόφιμα).

Πίνακας 1.2.1. Μερικές πρόσφατες εφαρμογές της HILIC

Αναλύτες	Στατική Φάση	Κινητή Φάση	Ανιχνευτής	Αναφορές
Κοκαΐνη και μεταβολίτες	Ενσωματωμένες πολικές ενώσεις	ACN: ρυθμιστικό μυρμηκικού	ESI-MS/MS	[223]
Πτερίνες (Βιοδείκτες)	Αμινιπροπυλο-πυριτία	ACN: ρυθμιστικό δ/μα οξικού οξέος	Φασματοσκοπία φθορισμού	[224]
Γλυκάνες από μονοκλωνικά αντισώματα	Διωντική	ACN:οξικό οξύ	ESI-MS	[225]
Κεφαλοσπορίνες	B-κυκλοδεξτρίνη	ACN:ρυθμιστικό δ/μα μυρμηκικών	UV	[226]
Αντι-ιικά φάρμακα	Πυριτία	ACN:ρυθμιστικό δ/μα μυρμηκικών	ESI-MS/MS	[227]
Βιταμίνες	Διόλη-πυριτία	ACN:ρυθμιστικό δ/μα οξικού οξέος	DAD	[54]
Σακχαρίτες	Διόλη-πυριτία	ACN: οξικό οξύ	ELSD	[55]

1.3. ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ

Ο όρος παρασιτοκτόνα περιλαμβάνει εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα και διάφορες άλλες ουσίες που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των παρασίτων. Η χημική ταξινόμηση βασίζεται στις λειτουργικές ομάδες της μοριακής τους δομής ή της βιολογικής δράσης τους. Η παρουσία υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον και η δημόσια ανησυχία για πιθανές τοξικές επιδράσεις τους, έχει αναγκάσει επίσημους διεθνείς οργανισμούς να καθορίσουν τα ανώτατα επιτρεπόμενα επίπεδα συγκέντρωσης των χημικών αυτών ουσιών. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, καθώς και στις ΗΠΑ μέσω της Εθνικής Έρευνας Φυτοφαρμάκων (National Pesticide Survey) δημοσιεύθηκαν λίστες ενώσεων με βάση τις επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία και τον κίνδυνο λόγω της παρουσίας τους στο περιβάλλον [91-93]. Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει αυστηρή νομοθεσία σχετικά με την ύπαρξη φυτοφαρμάκων στο νερό που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση. Η μέγιστη συγκέντρωση φυτοφαρμάκου δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,1 $\mu\text{g} / \text{L}$, ενώ το άθροισμα όλων των φυτοφαρμάκων πρέπει να είναι κάτω από 0,5 $\mu\text{g} / \text{L}$ [94-100]. Τα εμπορεύματα στα οποία γίνεται χρήση φυτοφαρμάκων, κυρίως φρούτα και λαχανικά, ελέγχονται για την ύπαρξη αυτών, αλλά λόγω της γενίκευσης της χρήσης ή τον πολλαπλασιασμό των φυτοφαρμάκων στην τροφική αλυσίδα, τα φυτοφάρμακα ελέγχονται επίσης σε προϊόντα ζωικής προέλευσης.

Το νερό και το έδαφος είναι οι κύριοι τομείς ενδιαφέροντος. Η εμφάνιση των φυτοφαρμάκων στα υπόγεια ύδατα, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες [διαλυτότητα, παραμονή φυτοφαρμάκου στο έδαφος, εκπλυσιμότητα (leachability) (Koc)] των ενώσεων που εμπλέκονται. Οι παραπάνω κίνδυνοι και ανησυχίες για την ασφάλεια του πόσιμου νερού και της μόλυνσης των τροφίμων έχουν πυροδοτήσει έντονες προσπάθειες από αναλυτικούς χημικούς για την ανάπτυξη μεθόδων που μπορούν να ανιχνεύσουν υπολείμματα σε επίπεδα κάτω των μg , σε αναλύσεις ρουτίνας.

Μέχρι τον Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο, οι ουσίες που χρησιμοποιούνταν ως φυτοφάρμακα στη γεωργία ήταν σχετικά περιορισμένες, απλές και πολλές από αυτές ήταν φυσικής προέλευσης, όπως το θείο. Μάλιστα, μερικές από τις ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται ακόμα και σήμερα. Με το Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο έγινε και σταδιακή διεύρυνση της χρησιμοποίησης πολυάριθμων συνθετικών οργανικών ουσιών με πολύπλοκη χημική δομή, με πρώτο το DDT. Σήμερα, στην Ελλάδα κυκλοφορούν περισσότερες από 100 τέτοιες χημικές ουσίες με τη μορφή αρκετών

εκατοντάδων σκευασμάτων. Θα αναφερθούν σύντομα, οι κύριες χημικές ομάδες των ευρύτερα χρησιμοποιούμενων φυτοφαρμάκων.

1.3.1. Οργανοχλωριωμένες ενώσεις

Είναι υδρογονάνθρακες στους οποίους άτομα άνθρακα είναι ενωμένα με άτομα χλωρίου. Γι' αυτό ονομάζονται και χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες. Τέτοιες ενώσεις είναι το DDT, παράγωγα του βενζολίου, κυκλοδιένια, κ.α. Ο ακριβής τρόπος δράσης των ενώσεων αυτών παραμένει άγνωστος.

1.3.2. Καρβαμιδικές ενώσεις

Ανακαλύφθηκαν από τις αρχές της δεκαετίας του '50 και αποτελούν μια πολύ σημαντική ομάδα ουσιών στην καταπολέμηση των εντόμων, μολονότι όχι τόσο μεγάλη όσο τα οργανοφωσφορικά. Πάντως σε πολλές από τις ιδιότητες τους, όπως ο τρόπος δράσης, το φάσμα τοξικότητας κ.α. είναι παρόμοιες με τα οργανοφωσφορικά. Μερικές καρβαμιδικές ενώσεις είναι οι aldicarb, bendiocarb, carbofuran. Όσο αφορά τον κίνδυνο αθροιστικής δηλητηρίασης, τα καρβαμιδικά είναι ασφαλέστερα από τα οργανοφωσφορικά και η ιστορία τους ως προς τα ατυχήματα είναι καλύτερη.

1.3.3. Πυρεθροειδή

Το πύρεθρο θεωρείται το αρχαιότερο φυσικό οργανικό εντομοκτόνο και ίσως το ιδανικότερο οικιακό εντομοκτόνο. Η τοξικότητα του στον άνθρωπο είναι πολύ χαμηλή, και έχει εντυπωσιακά ταχεία δράση, πλεονεκτήματα πολύ σημαντικά για οικιακή χρήση. Το πύρεθρο δρα πάνω στο νευρικό σύστημα αλλά ο τρόπος δράσης του δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστός. Αρχικά προκαλεί διέγερση και άμεση κατάρριψη (knock down), κατόπιν τα έντομα ή συνέρχονται (μετά 10 λεπτά περίπου) ή πεθαίνουν. Κάποια από τα πυρεθροειδή που έχουν κυκλοφορήσει στην αγορά είναι τα cypermethrin, deltamethrin.

1.3.4. Ασφυκτικά εντομοκτόνα

Οι ουσίες αυτές στη συνηθισμένη θερμοκρασία είναι αέρια ή πολύ πτητικά υγρά. Εισέρχονται στο σώμα των εντόμων από το αναπνευστικό σύστημα σε αέρια μορφή και τα σκοτώνουν με παρεμπόδιση των οξειδωτικών ενζύμων ή της αφομοίωσης του οξυγόνου από τους ιστούς. Χρησιμοποιούνται κυρίως σε κλειστούς χώρους ή σε χώρους που μπορούν να σκεπαστούν για να συγκρατηθεί το αέριο.

Επίσης, εφαρμόζονται στο έδαφος. Πολλά από αυτά είναι φυτοτοξικά και γι' αυτό χρησιμοποιούνται στο έδαφος πριν από τη σπορά ή φύτευση. Μερικά ασφυκτικά εντομοκτόνα είναι τα: ακρυλονιτρίλιο, διβρωμιούχο αιθυλένιο, και διθειάνθρακας.

1.3.5. Οργανοφωσφορικές ενώσεις

Περιλαμβάνουν εντομοκτόνα που είναι κυρίως, εστέρες, αμίδια ή ανυδρίτες του φωσφορικού ή φωσφονικού οξέος. Στην ομάδα αυτή ανήκουν μερικές από τις πιο δηλητηριώδεις ουσίες που χρησιμοποιούνται στη φυτοπροστασία. Πρωτοπόρος στην ανακάλυψη των οργανοφωσφορικών ήταν ο Γερμανός Schrader στη διάρκεια του Β' Παγκόσμιου Πολέμου. Το 1944 ανακάλυψε το parathion που χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα σε πολύ μεγάλες ποσότητες. Σήμερα, η ομάδα αυτή περιλαμβάνει το μεγαλύτερο αριθμό εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται στη γεωργία, όπως τα malathion, monocrotophos, fenthion, azinphos, chlorpyrifos acephate, methamidophos, omethoate και oxydemeton-methylon.

Οι οργανοφωσφορικές ενώσεις είναι τοξικές στα έντομα και τα υπόλοιπα ζώα επειδή δεσμεύουν ή παρεμποδίζουν την δράση ενζύμων ζωτικής σημασίας για το νευρικό σύστημα, των χολινεστερασών. Στο νευρικό σύστημα των σπονδυλωτών και των εντόμων, στα σημεία που τελειώνει το ένα νευρικό κύτταρο και αρχίζει το επόμενο δηλαδή στις συνάψεις, παρεμβάλλεται ένα χάσμα πλάτους 500 °Angstrom περίπου, το συναπτικό χάσμα. Για να περάσει το νευρικό ερέθισμα από το ένα κύτταρο στο άλλο πρέπει να περάσει το συναπτικό χάσμα. Αυτό, πραγματοποιείται με την παρέμβαση χημικής ουσίας, που στα έντομα και τα θερμόαιμα είναι συνήθως η ακετυλοχολίνη. Όταν το μήνυμα φθάσει στο τέλος ενός κυττάρου απελευθερώνεται μια πολύ μικρή ποσότητα ακετυλοχολίνης από τα κυστίδια κομβίων του νευρικού κυττάρου στα οποία αυτή περιέχεται, και γεφυρώνει το χάσμα. Μετά τη μεταβίβαση του ερεθίσματος η ακετυλοχολίνη υδρολύεται αμέσως με τη δράση του ενζύμου χολινεστεράση γνωστού και σαν ακετυλοχολινεστεράση και έτσι, η σύναψη αποφορτίζεται και υπάρχει η δυνατότητα μετάδοσης του επόμενου μηνύματος κ.ο.κ. Αυτού του είδους οι αντιδράσεις είναι στιγμιαίες (διαρκούν για κλάσμα μόνο του δευτερολέπτου) και συμβαίνουν συνεχώς κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Όταν όμως στη νευρική σύναψη φθάσει ένα οργανοφωσφορικό φυτοφάρμακο, αυτό προσκολλάται σταθερά πάνω στη χολινεστεράση, και έτσι την εμποδίζει να υδρολύσει την ακετυλοχολίνη. Αυτό καταλήγει σε συσσώρευση ακετυλοχολίνης στις συνάψεις, με συνέπεια τη διακοπή της μεταφοράς μηνυμάτων και την αχρήστευση

του νευρικού συστήματος. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο θάνατος στα θηλαστικά από παράλυση του αναπνευστικού συστήματος και στα έντομα από παράλυση του νευρικού τους κέντρου.

Μια ιδιαίτερη κατηγορία οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων αποτελούν τα ζιζανιοκτόνα που περιέχουν στο μόριό τους εκτός από τη φωσφονική ομάδα, την αμινομάδα και την καρβοξυλομάδα. Τέτοια ζιζανιοκτόνα είναι η [N-(φωσφονομέθυλο) γλυκίνη] (glyphosate- GLYP), το [dl-ομοαλανιν-4-υλ- (μεθυλ) φωσφονικό οξύ] (glufosinate-GLUF), η 4- [υδροξυ (μεθυλο) φωσφινυλο] -L-οϋλ-L-αλανυλ-L-αλανίνη (bialaphos-BIAL) και το (RS) -1-αμινοπρόπυλο φωσφονικό οξύ (ampropylfos)

Το GLYP είναι ένα μη επιλεκτικό ζιζανιοκτόνο ευρέως φάσματος, που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των μονοετών και πολυετών φυτών. Χρησιμοποιείται κυρίως στο καλαμπόκι, στη παραγωγή της σόγιας και στη διαμόρφωση χώρων στις αστικές περιοχές [68, 96]. Απορροφάται εντός των φύλλων και μεταφέρεται στις ρίζες του φυτού και στα ριζώματα μέσω του φλοιού. Όταν έρχεται σε επαφή με το έδαφος, το GLYP συνδέεται ισχυρά με σωματίδια του εδάφους και γι 'αυτό δεν μπορεί να απορροφηθεί από τα φυτά και δεν είναι πλέον φυτοτοξικό. Δρα παρεμβαίνοντας στο ένζυμο που καταλύει το έκτο στάδιο του μεταβολικού μονοπατιού του σικιμικού, 5-ενολ-πυροσταφυλσικιμική-3-φωσφορική συνθετάση (5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthetase), έχει μικρές χρόνιες και νευροτοξικές επιδράσεις και καμία εμφανή καρκινογόνο και μεταλλαξιογόνο δράση. Αν και το GLYP στοχεύει κυρίως την EPSP συνθετάση, η φωτοσύνθεση και η αναπνοή επίσης επηρεάζονται. Οι φυσικές, χημικές και τοξικολογικές ιδιότητες του GLYP είναι καλά τεκμηριωμένες [101-103]. Αποδομείται ταχέως και πλήρως από μικροοργανισμούς του εδάφους σε νερό, διοξείδιο του άνθρακα και φωσφορικό [104].

Το GLYP εμφανίστηκε στην αγορά στις αρχές της δεκαετίας του 1970 από τη Monsanto [96, 105]. Διάφορες μορφές του GLYP είναι σε ευρεία χρήση και περιλαμβάνουν ισοπροπυλαμίνη (π.χ. Roundup Original®), άλας καλίου (π.χ. Roundup WeatherMAX®) και άλας τριμεθυλσουλφονίου (π.χ. Touchdown®) [68]. Σύμφωνα με την ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, το GLYP έχει χαρακτηριστεί ως "U" (Unlikely –παρουσιάζεται ως απίθανος κίνδυνος σε κανονική χρήση) [106]. Ωστόσο, η κατάχρηση του GLYP στα γεωργικά προϊόντα μπορεί να αποτελέσει απειλή για τον καταναλωτή, αφού η παρουσία του σε αυτά δεν απομακρύνεται με απλό πλύσιμο. Μάλιστα, μελέτη παρουσίασε συσχέτιση της

εμφάνισης καρκίνου από το GLYP [107, 108] και φυσικά η κατάποση GLYP μπορεί να είναι θανατηφόρα [109]. Για τους λόγους αυτούς, σύμφωνα με την Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (Environmental Protection Agency-EPA) η μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση στο πόσιμο νερό είναι 0,7 $\mu\text{g/mL}$ [108]. Έχοντας τιμές $\log_{\text{ow}} < -3,4$ και pK_a 2.0, 2.6, 5.6, και 10.6, το GLYP είναι μία πολύ πολική και αμφοτερική ένωση [110]. Το πρώτο βήμα στην αποδόμηση του GLYP είναι η διάσπασή του σε γλυοξιλικό και αμινομεθυλφωσφονικό οξύ (AMPA).

Το GLUF ή το εναμμώνιο άλας του GLUF περιέχεται σε πολλά γνωστά ζιζανιοκτόνα του εμπορίου, όπως τα Ignite, Basta, Rely, Finale, Challenge και Liberty. Το GLUF είναι επίσης, ένα ευρέως φάσματος, μη-επιλεκτικό ζιζανιοκτόνο που χρησιμοποιούνται σε φυτώρια, αμπελώνες και οπωρώνες. Πρόκειται για μια πολύ πολική ένωση, ο συντακτικός τύπος της οποίας είναι παρόμοιος με εκείνον του GLYP. Είναι ένα συνθετικό ζιζανιοκτόνο, που σχετίζεται με το φυσικό προϊόν BIAL που παράγεται από τον *Streptomyces viridochromogenes* L. Και οι δύο ενώσεις (δηλ. BIAL, GLUF) περιέχουν φωσφινοθρικίνη (phosphinothricin) ως δραστικό συστατικό [111]. Η φωσφινοθρικίνη αναστέλλει τη δράση του ενζύμου της συνθετάσης της γλουταμίνης, οδηγώντας έτσι σε συσσώρευση τοξικών επιπέδων της αμμωνίας, καταστρέφοντας το μεταβολισμό της αμμωνίας και τέλος σε θάνατο του φυτού [97, 112]. Εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει ότι το GLUF βιομετατρέπεται άμεσα στο έδαφος. Η μητρική ένωση έχει χρόνο ημίσειας ζωής περίπου 3-11 ημέρες. Για το GLUF, η μικροβιακή αποδόμηση είναι το πιο σημαντικό μονοπάτι διάχυσης με το ρυθμό αποδόμησης να εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του εδάφους και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Μελέτες έχουν δείξει τον σχηματισμό δύο κύριων μεταβολιτών κατά τη διάρκεια της αποδόμησης. Πιο συγκεκριμένα, ο κύριος μεταβολίτης είναι το 3-μεθυλοφωσφινικοπροπionικό οξύ (3-methylphosphinicoacetic οξύ (MPPA) που παράγεται από την οξειδωτική απαμίνωση του GLUF, που αποδομείται περαιτέρω σε 2-μεθυλοφωσφινικοξικό οξύ (2-methylphosphinicoacetic οξύ) [113]. Ο μεταβολισμός του GLUF δεν αναμένεται να είναι τόσο γρήγορος στα υπόγεια ύδατα όσο στο έδαφος, λόγω των μειωμένων διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών, του σχετικά αραιού μικροβιακού πληθυσμού και συχνά λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας των υπόγειων υδάτων. Ο σχετικά μικρός χρόνος ημιζωής στο έδαφος δείχνει ότι υπάρχει μικρή πιθανότητα μεταφοράς του GLUF στα υπόγεια ύδατα.

Το BIAL είναι ένα αντιβιοτικό τριπεπτίδιο που παράγεται από τον μικροοργανισμό *Streptomyces hygroscopicus* και χρησιμοποιείται ως ζιζανιοκτόνο. Είναι ένα εμπορικά διαθέσιμο φυσικό φυτοτοξικό, το οποίο αποτελείται από φωσφινοθρισίνη και δύο L-αλανίνες [114]. Ο Πίνακας 1.3.1. συνοψίζει τα φυτοφάρμακα και τους μεταβολίτες τους με τις αντίστοιχες χημικές δομές τους.

Πίνακας 1.3.1. Οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα, οι μεταβολίτες και οι χημικές δομές τους.

Φυτο- φάρμακα	Χημικές Δομές	Μεταβολίτες	Χημικές Δομές
Glyphosate (GLYP)		Αμινομεθυλοφωσφονικό οξύ (AMPA)	
Glufosinate (GLUF)		MPPA	
Bialaphos (BIAL)		2-μεθυλοφωσφινικό οξύ L-Glufosinate	

Οι δυσκολίες στην εφαρμογή απλών μεθόδων για την εκχύλιση και τον προσδιορισμό των ενώσεων αυτών σε επίπεδα υπολειμμάτων έγκειται κυρίως στις ιδιότητές τους: υψηλή διαλυτότητα στο νερό, αδιάλυτα σε οργανικούς διαλύτες και τάση συμπλοκοποίησης. Ο προσδιορισμός των φυτοφαρμάκων αυτών έχει πραγματοποιηθεί με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας [115], ενώ από το 1980 ένα ευρύ φάσμα αναλυτικών τεχνικών έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του GLYP και σχετικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων της HPLC [116-118], της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης [119-121] και της αέριας χρωματογραφίας [122-124] σε συνδυασμό με ανιχνευτές φθορισμού ή φασματομετρίας μάζας.

1.4. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (Gas Chromatography-GC)

Η αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή μάζας αποτελεί εδώ και πολλά χρόνια ένα πρόσφορο πεδίο για την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων ιδιαίτερα για τη μελέτη οργανικών ενώσεων που είναι πτητικές, θερμικά σταθερές και έχουν μικρό μοριακό βάρος [125]. Υπάρχουν όμως ενώσεις που περιλαμβάνουν πολικές ομάδες, που δεν είναι πτητικές δε διαθέτουν θερμική σταθερότητα ή έχουν μεγάλο μοριακό βάρος. Οι ενώσεις αυτές είναι δύσκολο να διαχωριστούν με αέρια χρωματογραφία,. Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα αυτό αναπτύσσονται μέθοδοι στις οποίες γίνεται παραγωγοποίηση με χρήση αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης [97, 124, 126-132]. Γενικά, η παραγωγοποίηση χρησιμοποιείται για την αύξηση της πτητικότητας ή μείωση της πολικότητας της ένωσης, μείωση της θερμικής διάσπασης, αύξηση της απόκρισης του ανιχνευτή, αύξηση της διαχωριστικότητας και μείωση της διεύρυνσης των κορυφών. Συγκεκριμένα, ενεργές ομάδες όπως οι $-OH$, $-COOH$ αντιδρούν με το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης σχηματίζοντας έτσι ενώσεις με τις επιθυμητές ιδιότητες (π.χ. χαμηλότερο σημείο ζέσης, θερμικά σταθερές κ.α.). Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι χαρακτηριστικές ομάδες, οι οποίες παραγωγοποιούνται είναι πυρηνόφιλες και το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης ηλεκτρονιόφιλο. Προβλήματα που συχνά αντιμετωπίζονται κατά την παραγωγοποίηση είναι:

- α. οι παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα και
- β. η υγρασία, η ύπαρξη της οποίας είτε παρεμποδίζει είτε αντιδρά με τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης.

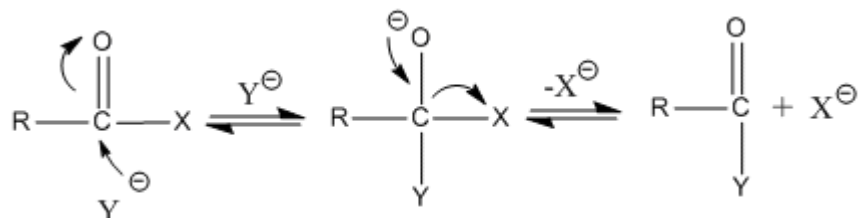
1.4.1. Παραγωγοποίηση στην αέρια χρωματογραφία

Γενικά, οι αντιδράσεις παραγωγοποίησης χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες:

α) αντιδράσεις αλκυλίωσης. Οι αντιδράσεις αυτές έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό την αντικατάσταση ενός ή περισσοτέρων ενεργών υδρογόνων χαρακτηριστικών ομάδων όπως $-OH$, $-COOH$, $-SH$, $-NH$, $-CONH$ και $-SO_2NH$ του αναλύτη, με αλκυλομάδες. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι αντιδράσεις εστεροποίησης, οι S_N αντιδράσεις πυρηνόφιλης υποκατάστασης, αντιδράσεις αλκυλίωσης με αλκυλαλογονίδια και άλλες.

β) αντιδράσεις ακετυλίωσης. Ο μηχανισμός των αντιδράσεων αυτών (Εικόνα 1.4.1.) βασίζεται στην πυρηνόφιλη προσθήκη μέσω ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου, οδηγώντας στην συνολική υποκατάσταση του πυρηνόφιλου Y^- . Ενώσεις που

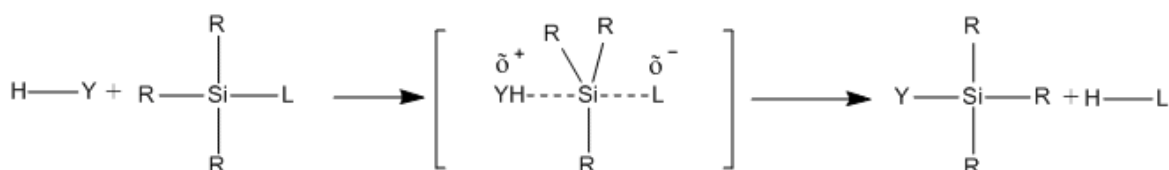
περιέχουν μία ή περισσότερες διαφορετικές λειτουργικές ομάδες, συνήθως περιλαμβάνουν ένα υδρογόνο που μπορεί να αντικατασταθεί και να παίξει το ρόλο του πυρηνόφιλου Y^- , π.χ. αλκοόλες, ενόλες, φαινόλες, θειόλες, αμίνες και αμίδια.



Εικόνα 1.4.1. Αντίδραση ακετυλίωσης

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν και οι αντιδράσεις σιλανοποίησης, όπου τα ενεργά υδρογόνα της ένωσης αντικαθίστανται από ομάδες σιλανίου. Ο μηχανισμός της αντίδρασης αυτής είναι ένας S_N2 μηχανισμός (Εικόνα 1.4.2.). Στη σιλανοποίηση, οι χαρακτηριστικές ομάδες παραγωγοποιούνται με την εξής σειρά:

αλκοόλες > φαινόλες > καρβοξυλικά οξέα > αμίνες > αμίδια

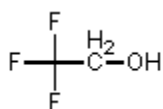


Εικόνα 1.4.2. Μηχανισμός αντίδρασης σιλανοποίησης

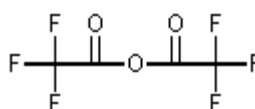
Αν και υπάρχουν κι άλλες αντιδράσεις παραγωγοποίησης, όπως κυκλοποίηση για το σχηματισμό οξίμης και αντιδράσεις με βορονικά οξέα, η σιλανοποίηση είναι πιο δημοφιλής καθώς καθιστά πτητικές και σταθερότερες τις οργανικές ενώσεις που περιλαμβάνουν ενεργά υδρογόνα. Το N,O-δισ(τριμεθυλοσιλυλο)τριφθορο ακεταμίδιο (BSTFA) το οποίο περιέχει 10% τριμεθυλοχλωρο σιλάνιο (TMCS) είναι το πιο γνωστό και συχνά χρησιμοποιούμενο αντιδραστήριο παραγωγοποίησης τόσο για βιολογικά δείγματα [127] όσο και για φυσικά προϊόντα [133-135]. Μαζί με το N,O-δισ(τριμεθυλοσιλυλο) ακεταμίδιο (BSA) έχουν μεγάλο εύρος εφαρμογής και συγκρίσιμη ισχύ σιλανοποίησης. Σε πολλές περιπτώσεις, προστίθεται τριμεθυλοσιλυλοχλωρο σιλάνιο ως καταλύτης. Άλλα αντιδραστήρια ή συνδυασμός αντιδραστηρίων σιλανοποίησης που έχουν προταθεί, είναι το τριμεθυλοσιλυλο

ιμιδαζόλιο (TMSI), ένα μίγμα των εξαμεθυλο δισιλαζανίου (HMDS) με TMCS και ένα μίγμα από TMSI/BSA/TMCS, με στόχο την παραγωγοποίηση στερεοχημικά παρεμποδιζόμενων υδροξυλομάδων. Το βασικό πρόβλημα με τα αντιδραστήρια σιλιανοποίησης είναι ότι κάποιες ενώσεις όπως οι αλδεύδες, τα αμίδια, τα καρβοξυλικά οξέα, οι εστέρες, οι κετόνες και οι φαινόλες κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες τείνουν να σχηματίζουν ανεπιθύμητα προϊόντα (artifacts) [136]. Τα προϊόντα αυτά είναι συνηθισμένα σε αντιδράσεις σιλιανοποίησης, οι οποίες οδηγούν σε πολλαπλές κορυφές της ίδιας ένωσης ή ανεπιθύμητες κορυφές στη χρωματογραφική ανάλυση. Επίσης, ένα ακόμα μειονέκτημα των αντιδραστηρίων αυτών είναι η τάση τους να υδρολύονται. Για το λόγο αυτό, τα δείγματα πριν τη προσθήκη του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης πρέπει να είναι όσο το δυνατόν απαλλαγμένα από υγρασία. Για παράδειγμα, ένα μόνο μικρόλιτρο νερού στο δείγμα μπορεί να “καταναλώσει” 20 μ l MSTFA [137]. Επιπλέον, τα δείγματα πρέπει να διατηρούνται ξηρά και μετά την αντίδραση, αφού υδρόλυση μπορούν να υποστούν και οι παραγωγοποιημένοι αναλύτες.

Επειδή υπάρχουν προβλήματα όσο αφορά την παραγωγοποίηση, τα όρια ανίχνευσης και την επαναληψιμότητα, γίνονται ενέργειες για την εύρεση εναλλακτικών αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης. Έτσι, επιστημονικά άρθρα [138, 139] μελετούν συγκριτικά τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης όσον αφορά την πορεία παραγωγοποίησης, τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα του κάθε αντιδραστηρίου. Στην εργασία του Zampolli, M. και των συνεργατών του [139] γίνεται αναφορά για τριφθορο-παράγωγα όπως η 2,2,2 τριφθοροαιθανόλη (TFE) και ο ανυδρίτης του τριφθοροξικού οξέος (TFAA) και συνδυασμούς αυτών (Εικόνα 1.4.3.). Μάλιστα, ο Deygour και οι συνεργάτες του [140] βρήκαν ότι τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης, TFE και TFAA παραγωγοποιούν επιτυχώς τα φυτοφάρμακα GLYP και AMPA και μετέπειτα μελέτες σε φυτοφάρμακα έκαναν χρήση αυτών των αντιδραστηρίων με επιτυχή αποτελέσματα [141-145]. Στην Εικόνα 1.4.4. παρατίθενται οι ομάδες που αντιδρούν με τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης (TFE και TFAA) και οι ομάδες που προκύπτουν, ενώ στην Εικόνα 1.4.5. παρατίθενται οι δομές οργανοφωσφορικών ενώσεων μετά από παραγωγοποίηση με τα αντιδραστήρια TFE και TFAA.

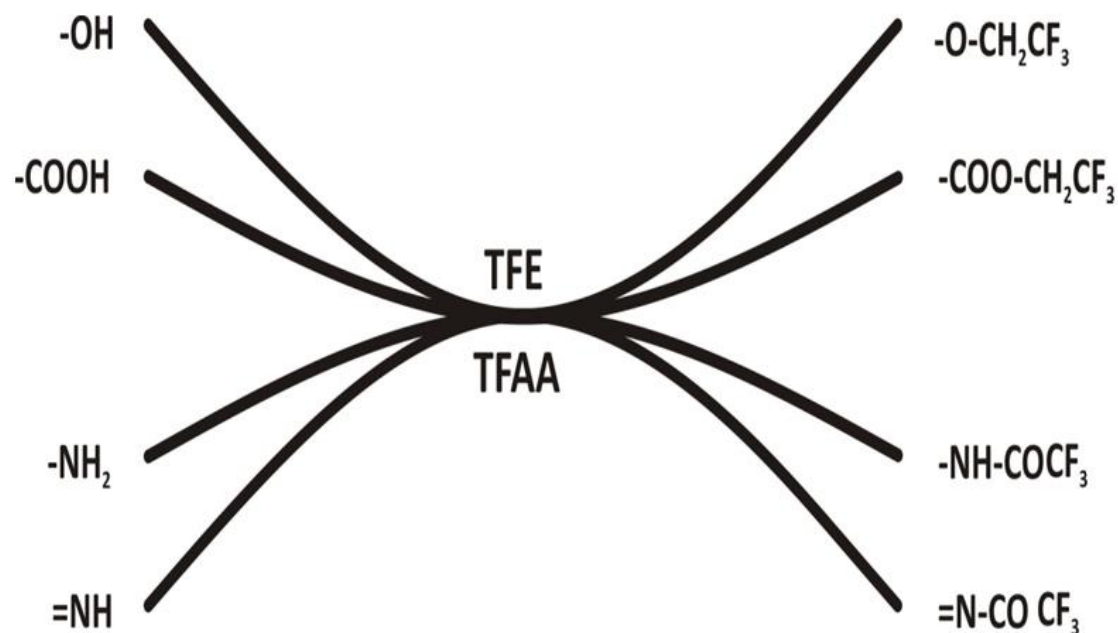


(α)

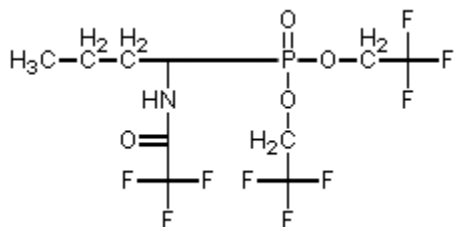


(β)

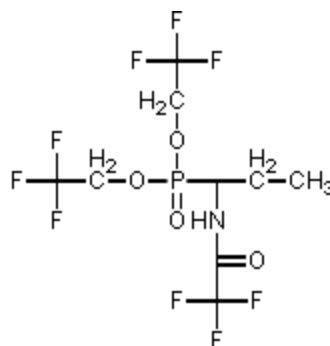
Εικόνα 1.4.3. Τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης: (α) 2,2,2 τριφθοροαιθανόλη (TFE) και (β) ανυδρίτης του τριφθοροξικού οξέος (TFAA)



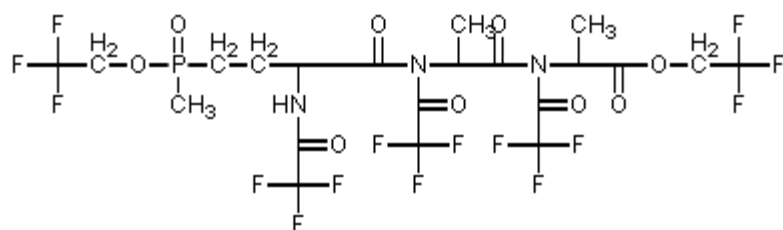
Εικόνα 1.4.4. Ομάδες που αντιδρούν με τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης TFE και TFAA και οι ομάδες που προκύπτουν. Όπως φαίνεται στην αντίδραση, η ομάδα $\text{CF}_3-\text{CO}-$ αντιδρά με την αμινο ομάδα του αναλύτη ενώ η ομάδα $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ με την καρβοξυλική ομάδα.



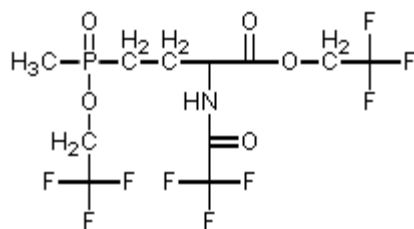
(α)



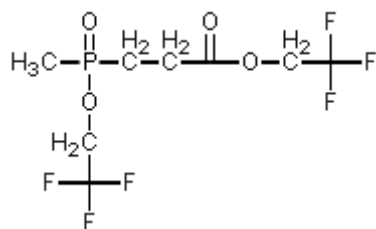
(β)



(γ)



(δ)



(ε)

Εικόνα 1.4.5. Οι οργανοφωσφορικές ενώσεις μετά από την παραγωγοποίηση με τα αντιδραστήρια TFE και TFPA: (α) (1-aminobutyl)phosphonic acid (ABPA), (β) aminopropylphosphonic acid (APPA), (γ) bialaphos (BIAL), (δ) glufosinate (GLUF), (ε) glyphosate (GLYP)

1.5. ΚΕΡΑΜΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Τα οξείδια των μετάλλων λόγω της μεγάλης ποικιλίας των ιδιοτήτων τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλά πεδία όπως στην κατάλυση, την αποθήκευση ενέργειας και την ηλεκτρονική [146]. Η sol-gel (υδρόλυμα-πηκτή) είναι μια εναλλακτική τεχνική για τη σύνθεση κεραμικών υλικών και έχει πλεονεκτήματα, όπως τη σύνθεση των υλικών υπό χαμηλή θερμοκρασία και τη χρήση απλού εξοπλισμού. Ιδιαίτερα, η τεχνική sol-gel είναι χρήσιμη για την παρασκευή κεραμικών ινών με χρήση εκμαγείου. Τα τελευταία χρόνια εμφανίζεται όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον για τη μελέτη κεραμικών υλικών, όπως αλουμίνα [147, 148], τιτανία [149], ζirkονία [146, 149-151], σταννία [152, 153] και πυριτία [154, 155] αλλά και σύνθετων κεραμικών υλικών, όπως αλουμίνα-σταννία [156], αλουμίνα-τιτανία [157], πυριτία-σταννία [158] και τιτανία-ζirkονία [159].

1.5.1. Αλουμίνα

Το οξείδιο του αργιλίου ή αλλιώς αλουμίνα, έχει μοριακό τύπο Al_2O_3 και είναι γνωστή με τις μορφές $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$, $\beta\text{-Al}_2\text{O}_3$ και $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$. Η αλουμίνα είναι ένα υλικό με μεγάλο εύρος εφαρμογών, οι οποίες περιλαμβάνουν την κατασκευή μονωτικών υψηλής θερμοκρασίας με τη μορφή στρωμάτων, κουβερτών, πινάκων και πυροπροστασίας [160-162], ακόμα ως υλικό στήριξης σε αντιδράσεις κατάλυσης υψηλής θερμοκρασίας [163] αλλά και σαν υλικό ενίσχυσης των μετάλλων, κεραμικών και πολυμερών [164-171]. Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι παρασκευής κεραμικής αλουμίνας, όπως η πυρόλυση [172], η κατάψυξη [173] και η τεχνική sol-gel [147].

1.5.2. Σταννία

Το οξείδιο του κασσιτέρου ή αλλιώς σταννία έχει μοριακό τύπο SnO_2 και βρίσκει αρκετές εφαρμογές, όπως στους ηλιακούς θερμοσίφωνες, σε ηλεκτρόδια και σε χημικούς αισθητήρες στερεής κατάστασης [174, 175]. Η σταννία παρασκευάζεται με διάφορους μεθόδους που περιλαμβάνουν τεχνικές, όπως sol-gel [176-178], μικροκυμάτων [179, 180] και υδροθερμική μέθοδο [181].

1.5.3. Πυριτία

Το οξείδιο της πυριτίας ή πυριτία με μοριακό τύπο SiO_2 είναι από τα πιο γνωστά και από τα πιο χρησιμοποιημένα κεραμικά υλικά. Χρησιμοποιείται ως

οικοδομικό υλικό, ως πρώτη ύλη της βιομηχανίας του πυριτίου, του γυαλιού και των κεραμικών. Επίσης, χρησιμοποιείται σε διάφορους τομείς, συμπεριλαμβανομένων των κατάλυση, χορήγηση φαρμάκων, διαχωρισμό και προσρόφηση [182, 183]. Η συνηθέστερη χρήση της πηκτής πυριτίου είναι ως προσροφητικό υγρασίας, μέσα σε συσκευασίες ευαίσθητων στην υγρασία αντικειμένων. Η πυριτία μπορεί να κατασκευαστεί και αυτή με την απλή μέθοδο sol-gel [184].

1.5.4. Τιτανία

Το οξείδιο του τιτανίου ή τιτανία έχει μοριακό τύπο TiO_2 χρησιμοποιείται σε πολλές εφαρμογές λόγω των μοναδικών της ιδιοτήτων. Η τιτανία είναι γνωστή ότι φέρει διάφορες δομές: το ρουτίλιο (rutile), που είναι θερμοδυναμικά σταθερό, τον ανατάση (anatase) που είναι ασταθής σε χαμηλές θερμοκρασίες και τον μπρουκίτη (brookite) που σχηματίζεται σε υδροθερμικές συνθήκες [185]. Με τη μορφή του ανατάση, η τιτανία χρησιμοποιείται συχνά ως φωτοκαταλύτης, λόγω της χημικής του σταθερότητας, του χαμηλού κόστους και της μη τοξικότητας. Η κατασκευή της τιτανίας περιλαμβάνει μεθόδους όπως, υδροθερμικές [186] και sol-gel [159, 187].

1.5.5. Ζirkονία

Το οξείδιο του ζirkονίου ή αλλιώς ζirkονία έχει μοριακό τύπο ZrO_2 και είναι και αυτό ευρέως γνωστό. Χρησιμοποιείται στην κατασκευή των αεροπλάνων ακόμα και στα διαστημικά σκάφη, λόγω του υψηλού σημείου τήξης, της αντοχής και της ανθεκτικότητας στη χαμηλή θερμική αγωγιμότητα και τέλος στην αντοχή του στη διάβρωση και την οξείδωση [188]. Η ζirkονία παρασκευάζεται με διάφορες μεθόδους, μια από τις οποίες είναι η sol-gel [146].

Σύμφωνα με τα παραπάνω, μία βασική τεχνική για τη σύνθεση κεραμικών υλικών είναι η sol-gel. Κύρια πλεονεκτήματα αυτής είναι η χαμηλή θερμοκρασία και η ομοιογένεια του προϊόντος.

1.6. Η ΤΕΧΝΙΚΗ SOL GEL

Η sol-gel είναι μία τεχνική παραγωγής στερεών υλικών από μικρά μόρια [189] και αποτελεί μία σημαντική τεχνική για την παρασκευή των οξειδίων των μετάλλων, όπως αλουμίνια, πυριτία, σταννία, τιτανία και ζirkονία. Οι βασικές αρχές της τεχνικής έχουν γίνει γνωστές εδώ και δύο αιώνες και οι ρίζες της για τη σύνθεση κεραμικών υλικών χρονολογούνται από το δέκατο έκτο αιώνα και ίσως ακόμη και πιο πριν [228]. Στις αρχές της δεκαετίας του 1960, η εν λόγω τεχνική βρήκε εφαρμογή στην παρασκευή οξειδίου του θορίου και μικροσφαιριδίων διοξειδίου του ουρανίου που χρησιμοποιούνταν στην πυρηνική βιομηχανία [190]. Από τα πρώτα χρόνια της εφαρμογής της τεχνικής sol-gel, το ενδιαφέρον έχει αυξηθεί δραματικά και παρατηρήθηκε σημαντική τεχνολογική εξέλιξη στον τομέα αυτό. Ο όρος «sol-gel» αποδίδεται σε όλες εκείνες τις διεργασίες κατά τις οποίες ένα διάλυμα ή αλλιώς sol μετατρέπεται σε μία άκαμπτη πορώδη μάζα, δηλαδή μία γέλη ή αλλιώς πήκτωμα (gel). Δηλαδή, είναι μία τεχνική κατά την οποία σχηματίζονται μεγάλα ανόργανα πολυμερή [191].

Ο όρος sol αναφέρεται σε μια διασπορά των κολλοειδών σωματιδίων μίας φάσης σε ένα ρευστό μέσο. Για παράδειγμα, όταν τα κολλοειδή σωματίδια αιωρούνται στον αέρα, στο νερό, ή σε ένα οργανικό υγρό, χρησιμοποιούνται οι όροι αερόλυμα (αεροζόλ), υδρόλυμα και οργανοσόλη, αντίστοιχα. Τα σωματίδια στο sol είναι εξ ορισμού κολλοειδή, δηλαδή σε θερμοκρασία δωματίου παραμένουν διεσπαρμένα λόγω της κίνησης Brown. Αυτό συνήθως απαιτεί το μέσο μέγεθος σωματιδίων να είναι μικρότερο από 1 μm. Στην πράξη, το μέσο μέγεθος των σωματιδίων των προδρόμων ενώσεων που χρησιμοποιούνται στη sol-gel μπορεί να αποτελούνται από κάπως μεγαλύτερα σωματίδια (διαμέτρου μερικών μικρομέτρων). Το gel είναι ένα τρισδιάστατο δίκτυο μιας στερεής φάσης με μία εγκλωβισμένη και ακινητοποιημένη συνεχή υγρή φάση [189, 190].

1.6.1. Στάδια της τεχνικής sol-gel

Η εφαρμογή της τεχνικής sol-gel περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

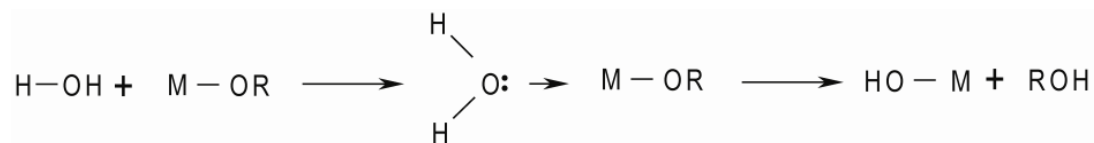
- α) υδρόλυση των πρόδρομων ενώσεων και σχηματισμός των sol (Hydrolysis)
- β) πολυσυμπυκνωση των υδρολυμένων προδρόμων ενώσεων-πηκτωματοποίηση (Condensation)
- γ) γήρανση (Gelation)
- δ) ξήρανση (Drying)

ε) πύρωση (Densification, Firing)

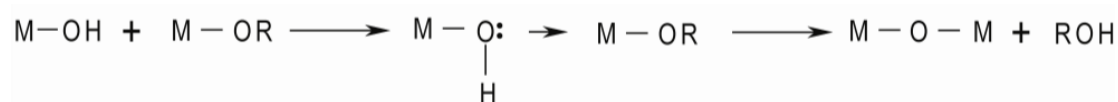
Τα sols μπορούν να παρασκευασθούν από οργανικές και ανόργανες ενώσεις. Οι αντιδράσεις υδρόλυσης και πολυσυμπύκνωσης συνήθως συμβαίνουν ταυτόχρονα και οι ταχύτητες αντίδρασης εξαρτώνται από τον τύπο της πρόδρομης ένωσης καθώς και τις συνθήκες της αντίδρασης, όπως το pH, τη θερμοκρασία και την ποσότητα της αρχικής ένωσης [191, 192].

Η υδρόλυση των αλκοξυ πρόδρομων ενώσεων ($\equiv M-OR_n$, όπου το M είναι το άτομο μετάλλου και R είναι η αλκυλομάδα) συμβαίνει λόγω της πυρηνόφιλης υποκατάστασης (S_N2) των αλκοξυ ομάδων από το νερό. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει πυρηνόφιλη προσθήκη ακολουθούμενη από μεταφορά πρωτονίων (βλέπε εξίσωση παρακάτω).

Οι υδρολυμένες πρόδρομες ενώσεις ($\equiv M-OH$) μπορούν να αντιδράσουν είτε με αλκοξυ πρόδρομες ενώσεις (alcoxolation) είτε με άλλες υδρολυμένες πρόδρομες ενώσεις (oxolation). Και στις δύο περιπτώσεις το αποτέλεσμα είναι η πολυσυμπύκνωση [193, 194].



Υδρόλυση



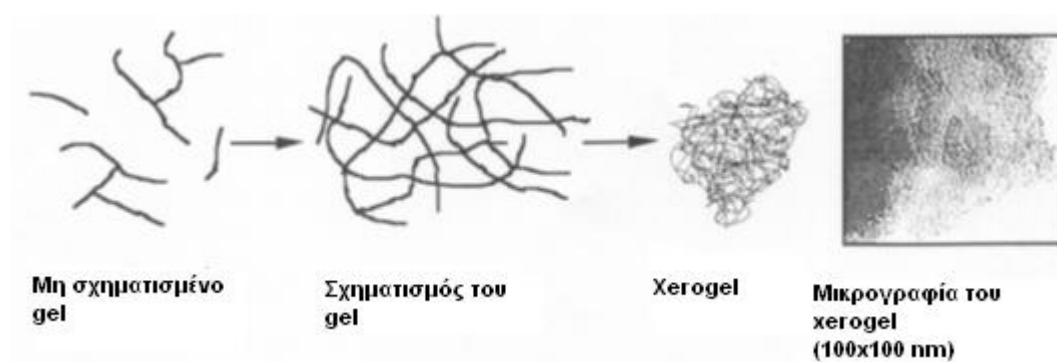
Αντίδραση με αλκοξυ πρόδρομες ουσίες (Alcoxolation)



Αντίδραση με υδρολυμένες ουσίες (Oxolation)

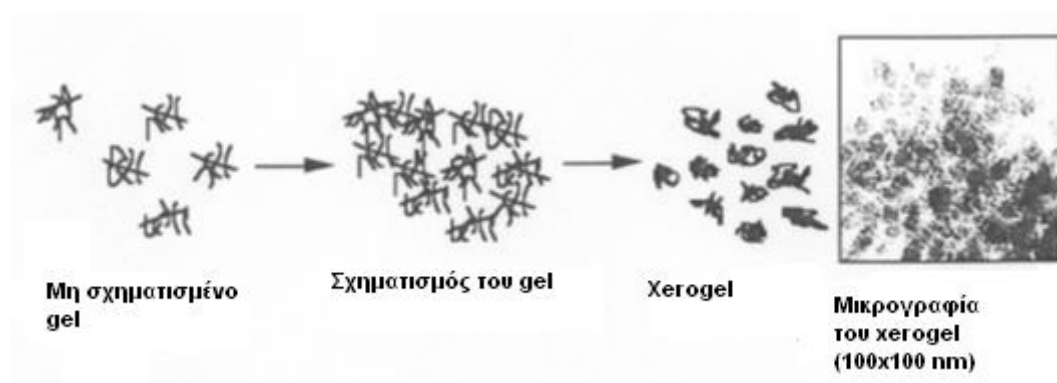
Πρέπει να γίνει αναφορά και στη δυνατότητα χρήσης περισσότερων της μιας πρόδρομης ένωσης με διαφορετικά μέταλλα ($M-OR_n$, $'M-OR_n$), των οποίων το αποτέλεσμα είναι ομο- $(M-O-M)$ ή ετερο-μεταλλικά $(M-O-'M)$ προϊόντα [191, 192].

Η πρωτονίωση των αλκοξειδίων (alkoxide ligands) συμβαίνει εύκολα με την παρουσία οξέων. Αυτό μπορεί να επηρεάσει την πολυσυμπύκνωση με τον σχηματισμό μερικώς υδρολυμένων ανόργανων πολυμερών. Η συμπύκνωση τότε, κατά προτίμηση, κατευθύνεται προς τα άκρα της αλυσίδας, οδηγώντας σε πιο γραμμικά (λιγότερο διακλαδισμένα) ανόργανα πολυμερή (gel) (Εικόνα 1.6.1) [194].



Εικόνα 1.6.1. Σχηματική αναπαράσταση ζελατινοποίησης, υπό όξινες συνθήκες

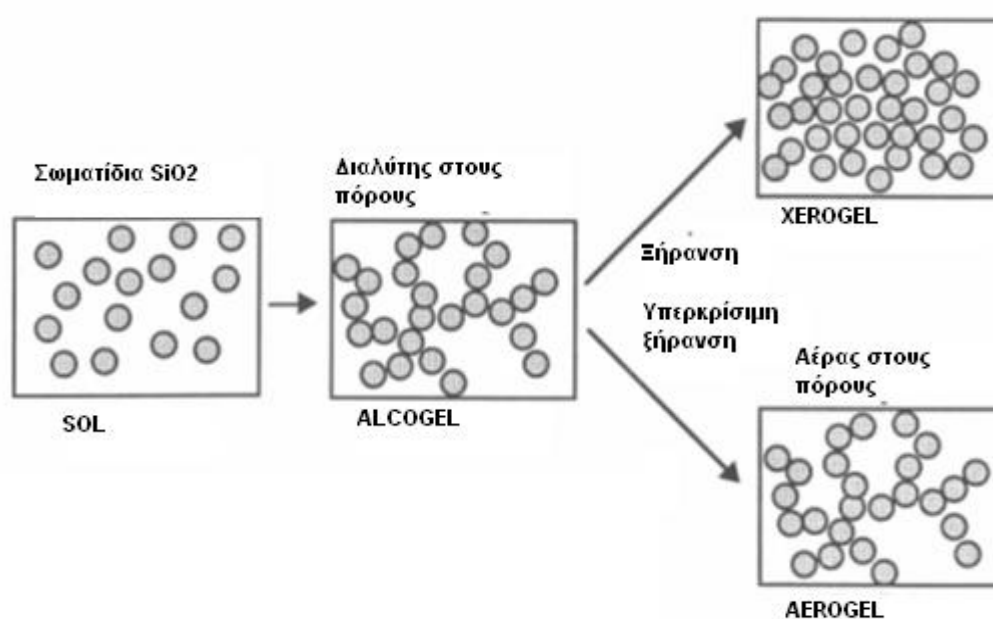
Σε υψηλό pH, παρουσία βάσεων, όπου κυριαρχούν συνθήκες που ευνοούν τη γρήγορη υδρόλυση, τα οξείδια σχηματίζουν διακλαδισμένες μορφές συμπλεγμάτων που δεν αλληλεπιδρούν πριν από την ξήρανση και συμπεριφέρονται έτσι, ως απομονωμένα είδη. Κατά την ξήρανση, αρχίζει να γίνεται η σύνδεση των διαφορετικών συμπλεγμάτων με συνέπεια τον σχηματισμό ανόργανου πολυμερούς (gel) (Εικόνα 1.6.2.).



Εικόνα 1.6.2. Σχηματική αναπαράσταση ζελατινοποίησης, υπό βασικές συνθήκες.

Η πολυσυμπύκνωση, η οποία μακροσκοπικά θεωρείται ως πηκτωματοποίηση, οδηγεί σε ένα τρισδιάστατο άκαμπτο δίκτυο, το gel. Η γήρανση του gel περιλαμβάνει πολυμερισμό, απομάκρυνση του διαλύτη (syneresis) και εκτράχυνση (coarsening). Οι ομάδες MOH και MOR που δεν αντέδρασαν συμπυκνώνονται κατά τη γήρανση, οδηγώντας σε αυξημένη συνδεσιμότητα και αντοχή του gel προκαλώντας τη συρρίκνωσή του που καταλήγει στη συναίρεση (αποβολή υγρού από τους πόρους). Διαφορές στο πορώδες υλικό μπορεί, επίσης, να οφείλονται στις διαδικασίες διάλυσης-καθίζησης, όπου τα μικρά σωματίδια θα εξαφανιστούν και οι μικροί πόροι θα γεμίσουν (εκτράχυνση). Κατά συνέπεια, η διεπιφάνεια μειώνεται και το μέσο μέγεθος πόρων αυξάνεται [192, 193].

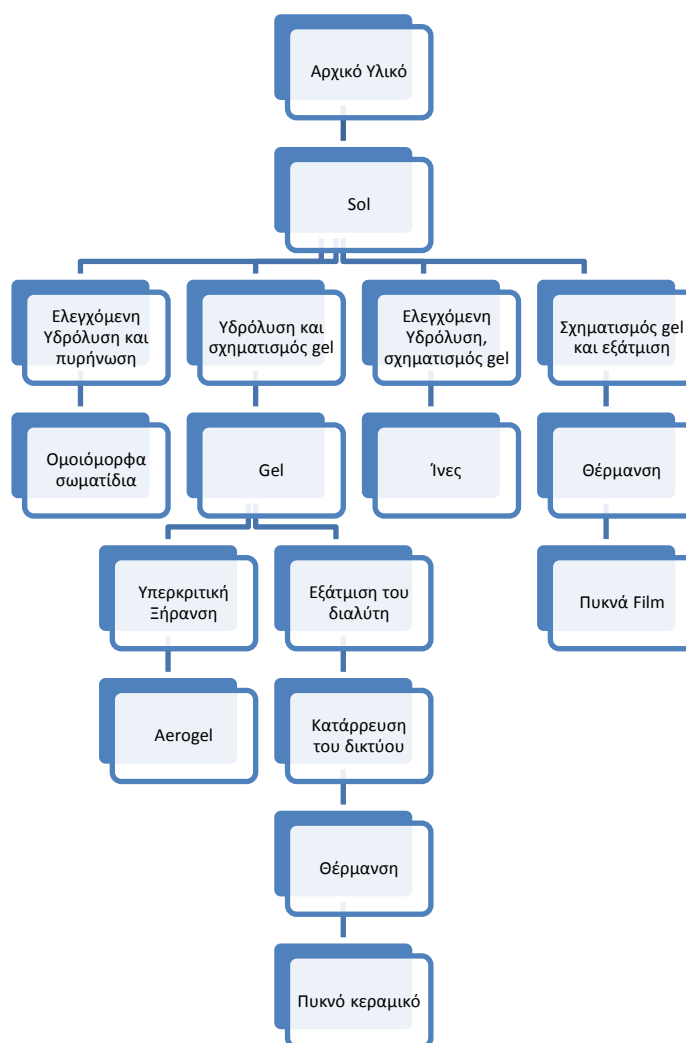
Αφού τελειώσει η μετατροπή του sol-gel, τότε ο διαλύτης μπορεί να απομακρυνθεί. Ανάλογα με τον τρόπο απομάκρυνσης του διαλύτη έχουμε διαφορετικά προϊόντα. Αν ο διαλύτης απομακρύνεται με κλασική ξήρανση, όπως για παράδειγμα εξάτμιση, το παραγόμενο προϊόν ονομάζεται xerogel. Εάν η απομάκρυνσή του γίνεται με υπερκρίσιμη εκκένωση χρησιμοποιώντας υψηλή θερμοκρασία, υπερκρίσιμο CO₂ (supercritical CO₂), τότε το προϊόν ονομάζεται aerogel. Τα xerogels είναι πιο πυκνά από τα aerogels, έχουν μεγάλες επιφάνειες και είναι συχνά μικροπορώδη (Εικόνα 1.6.3.). Πρόσφατα, έχουν χρησιμοποιηθεί ιοντικά υγρά κατά την διάρκεια των διαδικασιών ξήρανσης και ασβεστοποίησης και τα υλικά τότε ονομάζονται ionogels.



Εικόνα 1.6.3. Σχηματισμός alcogels, xerogels και aerogels των σωματιδίων SiO₂

Κατά την ξήρανση, για τον σχηματισμό του xerogel μετά από την απομάκρυνση του διαλύτη μέσω κλασικής εξάτμισης, οι γεμάτοι με διαλύτη πόροι που υπάρχουν μέσα στο πολυμερικό πηκτώμα αρχίζουν να εκκενώνονται και να καταρρέουν με συνέπεια την δημιουργία επιπρόσθετων δεσμών μεταξύ των διαφορετικών αλυσίδων του πολυμερούς. Έτσι ελεύθερες ομάδες $-OH$ και $-OR$ που δεν είχαν αρχικά αντιδράσει έρχονται σε επαφή. Οι διαφορετικές δομές των πηκτωμάτων με αργή (όξινη κατάλυση) και γρήγορη υδρόλυση (βασική κατάλυση) ανταποκρίνονται διαφορετικά στην απομάκρυνση του διαλύτη κατά την διάρκεια της ξήρανσης. Στην περίπτωση της όξινης κατάλυσης, όπου υπάρχει χαμηλός βαθμός διασταυρούμενης σύνδεσης μεταξύ των διαφορετικών αλυσίδων, οι πόροι καταρρέουν σε μεγαλύτερο βαθμό με συνέπεια την δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού επιπρόσθετων δεσμών μεταξύ των διαφορετικών αλυσίδων του πολυμερούς, σχηματίζοντας πηκτώμα υψηλής πυκνότητας που είναι αρκετά μικροπορώδη. Στα πηκτώματα βασικής κατάλυσης, τα πολυμερή είναι μεγαλύτερα και βρίσκονται σε μορφή συμπλεγμάτων, παρουσιάζουν υψηλότερο βαθμό διασταυρούμενης σύνδεσης και πριν τη ξήρανση δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Κατά την ξήρανση αρχίζει να πραγματοποιείται η σύνδεση των διαφορετικών συμπλεγμάτων χωρίς να αλλάζει σε μεγάλο βαθμό η δομή των συμπλεγμάτων. Έτσι, τα ξηραμένα πηκτώματα βασικής κατάλυσης είναι χαμηλότερης πυκνότητας και έχουν μεγαλύτερους πόρους σε σχέση με τα αντίστοιχα της όξινης κατάλυσης [196].

Κατά την πύρωση, όλες οι οργανικές ενώσεις απομακρύνονται από τα ανόργανα υλικά με θέρμανση. Η πύρωση συχνά οδηγεί σε μηχανικά σταθερότερα υλικά, αλλά η πυροσυσσωμάτωση μπορεί να προκαλέσει την αύξηση της πυκνότητας των υλικών και του όγκου των πόρων και τη μείωση της επιφανείας. Να σημειωθεί ότι τα gels δεν είναι το μόνο τελικό προϊόν. Η παρακάτω εικόνα δείχνει τα διάφορα προϊόντα που μπορούν να παρασκευαστούν.



Εικόνα 1.6.4. Η ποικιλοπλοκότητα των προϊόντων υπό διαφορετικές sol-gel τεχνικές

1.6.2. Πλεονεκτήματα της τεχνικής sol-gel

Τέσσερα είναι τα κύρια πλεονεκτήματα της χρήσης των τεχνικών sol-gel έναντι των παραδοσιακών μεθόδων παρασκευής των κεραμικών υλικών [196, 197]:

- Καθαρότητα του τελικού προϊόντος. Καθώς η τεχνική χρησιμοποιεί μοριακές πρόδρομες ενώσεις (molecular precursors) μπορούν να εφαρμοστούν κλασικές τεχνικές καθαρισμού, όπως απόσταξη, εξάχνωση, χρωματογραφία και ανακρυστάλλωση.
- Καλύτερος έλεγχος στοιχειομετρίας. Η χρήση των μοριακών πρόδρομων ουσιών: Οι διαδικασίες του sol-gel επιτρέπουν την ακριβή ανάμιξη ποσοτήτων των αρχικών υλικών σε διάλυμα με έλεγχο της ακριβούς στοιχειομετρίας έτσι ώστε να έχουμε τις επιθυμητές ιδιότητες κατά την πύρωση. Αυτή η πλευρά της τεχνικής είναι ιδιαίτερα σημαντική για την παραγωγή σύνθετων οξειδίων.

- Σύνθεση σε χαμηλή θερμοκρασία. Λόγω της ομοιογένειας του προϊόντος της ξηραμένης σκόνης/gel και το μικρότερο μέγεθος σωματιδίων σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, η πυρήνωση (nucleation) και η ανάπτυξη των κρυσταλλικών φάσεων μπορεί να συμβεί σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Αυτό επιτρέπει επίσης, τη σύνθεση μετασταθών φάσεων και την ένταξη οργανικών ή άλλων ενώσεων με χαμηλή θερμική σταθερότητα στο τελικό προϊόν. Τα πτητικά υλικά δεν χάνονται και μπορούν να σχηματισθούν άμορφες φάσεις. Οι χαμηλότερες θερμοκρασίες αποτρέπουν τις επιπτώσεις της πυροσυσσωμάτωσης των σωματιδίων.
- Έλεγχος των κεραμικών ιδιοτήτων μέσω του ελέγχου των παραμέτρων. Η μεταβολή των συνθηκών αντίδρασης επηρεάζει τις μορφολογίες των προϊόντων και τις βασικές (bulk) ιδιότητες. Η μεταβολή του pH, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση, και ο χημικός έλεγχος των ρυθμών υδρόλυσης και συμπύκνωσης επηρεάζουν δραματικά το τελικό προϊόν. Χρήση της προσομοίωσης σε υπολογιστή και μαθηματικά μοντέλα μπορούν να προβλέψουν την συμπεριφορά των πρόδρομων ουσιών κάτω από διαφορετικές συνθήκες, και την πολυπλοκότητα των αντιδράσεων δίνοντας μια εικόνα για το πώς η αντίδραση θα μπορούσε να προχωρήσει και έτσι το πώς η φύση του τελικού προϊόντος μπορεί να ελεγχθεί.

Επιπροσθέτως, με τη τεχνική της sol-gel μπορεί να επηρεαστεί το χαμηλό ή υψηλό πορώδες του τελικού προϊόντος και υπάρχει η δυνατότητα επικάλυψης σε μεγάλες και πολύπλοκες επιφάνειες. Από την άλλη, το κόστος των πρόδρομων ουσιών και η μεγάλη συρρίκνωση είναι μερικοί από τους περιορισμούς που συνδέονται με την τεχνική αυτή.

1.6.3. Εφαρμογές της τεχνικής sol-gel

Η τεχνική sol-gel είναι εξαιρετικά σημαντική για την παραγωγή προηγμένων υλικών (οξειδίων) με επιθυμητές καταλυτικές, ηλεκτρικές ή οπτικές ιδιότητες. Η ποικιλία και η ευελιξία των τεχνικών sol-gel επιτρέπει την προσαρμογή των υλικών με πολύ συγκεκριμένες ιδιότητες. Για παράδειγμα, νανοκρυσταλλική σκόνη οξειδίου με μεγάλη επιφάνεια είναι σημαντική στην κατάλυση. Η παραγωγή aerogel βαναδίου-πυριτίας με τη τεχνική sol-gel που ακολουθείται από υπερκρίσιμη ξήρανση δίνει ένα υλικό μεγάλης επιφανείας που είναι ιδιαίτερα επιθυμητό για τη χρήση του ως

ετερογενής καταλύτης [198]. Νανοκρυσταλλική τιτανία χρησιμοποιείται σε ηλιακές κυψέλες (solar cells) ευαισθητοποιημένες με χρωστικές (dye-sensitized) [196]. Το σύνθετο κεραμικό υλικό αλουμίνα-τιτανία που παρασκευάστηκε με την τεχνική sol-gel σε επίστρωση σε υάλινα υποστρώματα χρησιμοποιείται σε καταλυτικές εφαρμογές [199]. Επίσης, με τη τεχνική sol-gel μπορούν να παρασκευαστούν αισθητήρες σταννίας, οι οποίοι ανιχνεύουν την ρύπανση του περιβάλλοντος από CO και NO₂ [200].

1.6.4. Επικάλυψη εκμαγείων με τη τεχνική sol-gel

Τα τελευταία χρόνια η χρήση της τεχνικής sol-gel αυξάνεται και μία σημαντική χρήση της είναι η επικάλυψη (η επίστρωση) ενός υλικού με ένα ή και περισσότερα στρώματα από το sol. Μάλιστα, το sol μπορεί να αποτελείται από μία χημική ουσία ή μίγμα περισσοτέρων (σύνθετο υλικό). Το υλικό στο οποίο γίνεται η επικάλυψη ονομάζεται εκμαγείο. Με την αφαίρεση του εκμαγείου, η τελική μορφολογία και ιδιαίτερα το πορώδες του τελικού υλικού αποκτούν εντελώς διαφορετικά χαρακτηριστικά τα οποία φαίνονται χρήσιμα σε πολλές εφαρμογές.

Τα υλικά επιστρώνονται για μια σειρά από λόγους: Οι επιστρώσεις μπορούν να κάνουν μια ουσία βιοσυμβατή, να αυξήσουν τη θερμική, μηχανική ή χημική σταθερότητα του υλικού, να αυξήσουν την προστασία από φθορά, να αυξήσουν την αντοχή ή το χρόνος ζωής, να μειώσουν τη τριβή, να εμποδίσουν τη διάβρωση ή να αλλάξουν τις συνολικές φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες του υλικού. Υπάρχουν πολυάριθμες διαδικασίες επίστρωσης που χρησιμοποιούνται ευρέως συμπεριλαμβανομένων της χημικής αναγωγής, της παλμικής εναπόθεσης με λέιζερ, της μηχανικής άλεσης, της επικάλυσης με εμβάπτιση, της επίστρωσης με sol-gel και της ηλεκτροχημικής εναπόθεσης. Η πλειοψηφία αυτών των τεχνικών χρησιμοποιείται κατά προτίμηση για να επικαλύψει επίπεδα υποστρώματα. Ωστόσο, όταν πιο πολύπλοκα σχήματα απαιτούν επίστρωση, πολλές από τις προαναφερθείσες τεχνικές έχουν σοβαρά μειονεκτήματα. Στην περίπτωση αυτή, προτείνεται η μέθοδος sol-gel, η οποία μπορεί να διεξαχθεί σε διάλυμα [201].

Οι μακροπορώδεις δομές μπορούν να κατασκευαστούν με χρήση εκμαγείου. Μάλιστα, ως εκμαγεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν μικρές σφαίρες από καουτσούκ (latex), αφρολέξ από πολυμερές, γαλάκτωμα σταγονιδίων και ίνες πολυπροπυλενίου [202-210]. Η τεχνική είναι αρκετά απλή: Το εκμαγείο εμβαπτίζεται στο sol. Μετά

από το στάδιο της μετατροπής του sol σε gel και της ξήρανσης, το εκμαγείο απομακρύνεται και το αποτέλεσμα είναι μία μακροπορώδη δομή.

1.6.5. Εφαρμογές της τεχνικής sol-gel με τη χρήση εκμαγείων

Σύμφωνα με τη μελέτη του Jia Li και των συνεργατών του, παρασκευάστηκε κεραμική ίνα ζirkονίας με χρήση εκμαγείου ίνας προπυλενίου για τον προσδιορισμό της μελαμίνης στο γάλα [151]. Ο Yuan Zhang και οι συνεργάτες του κατασκεύασαν μακροπορώδη μονόλιθο αλουμίνας με χρήση αφρού πολυστυρένιου ως εκμαγείου πληρώνοντάς το με sol αλουμίνας [204]. Ακόμα, έχουν συντεθεί σφαιρίδια αλουμίνας, τιτανίας και ζirkονίας με τη χρήση σφαιριδίων από καουτσούκ ως εκμαγεία, από τον Holland και τους συνεργάτες του [209]. Επίσης, ο Hirotomo Nishihara και οι συνεργάτες του, κατασκεύασαν σύνθετο μονόλιθο πυριτίας-αλουμίνας με εσωτερική μακροπορώδη δομή χρησιμοποιώντας σωλήνες πολυπροπυλενίου ως εκμαγεία και εμβαπτίζοντάς τα σε παγωμένο νερό [207].

1.7. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

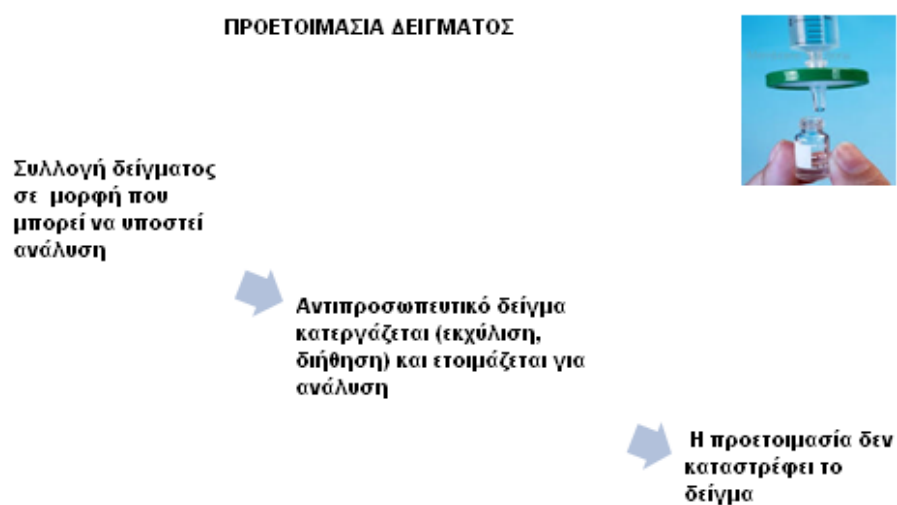
Τα δείγματα που αναλύονται, σε ένα σύγχρονο αναλυτικό εργαστήριο, ποικίλουν ανάλογα με τη φυσική τους κατάσταση (στερεά, υγρά ή αέρια) ή την πολυπλοκότητά τους. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν, είτε είναι αρκετά πολύπλοκα λόγω της παρουσίας σύνθετου υποστρώματος είτε δεν βρίσκονται στην απαιτούμενη για την ανάλυση, φυσική κατάσταση. Έτσι, το στάδιο της προκατεργασίας του δείγματος κρίνεται απαραίτητο πριν την ανάλυση του δείγματος (Εικόνα 1.7.1.)



Εικόνα 1.7.1. Διάγραμμα που φαίνονται τα διάφορα στάδια της προκατεργασίας

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

παραγωγοποίησή τους χωρίς την καταστροφή αυτών, για βελτιωμένη ανίχνευση ή καλύτερο διαχωρισμό (Εικόνα 1.7.2.)



Εικόνα 1.7.2. Στάδια προετοιμασίας ενός δείγματος

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

Πολλές φορές, η προκατεργασία του δείγματος μπορεί να απαιτήσει περισσότερο χρόνο για την ανάπτυξη των διαφόρων σταδίων της, σε σύγκριση με το διαχωρισμό στην HPLC ή στην GC και την επεξεργασία των δεδομένων. Επιπλέον, η προκατεργασία δείγματος μπορεί να περιλαμβάνει διάφορες μεθόδους και στάδια, έτσι ώστε να αποτελεί ένα ιδιαίτερης σημασίας στάδιο της ανάπτυξης μιας χρωματογραφικής μεθόδου. Τέλος, η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα μιας μεθόδου συχνά, καθορίζονται από τη διαδικασία προκατεργασίας του δείγματος. Για όλους αυτούς τους λόγους, το στάδιο της προκατεργασίας του δείγματος επιβάλλεται να είναι προσεκτικά μελετημένο. Επίσης, η ανάκτηση των προσδιοριζόμενων συστατικών κατά την προκατεργασία του δείγματος θα πρέπει να είναι ποσοτική, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία της μεθόδου.

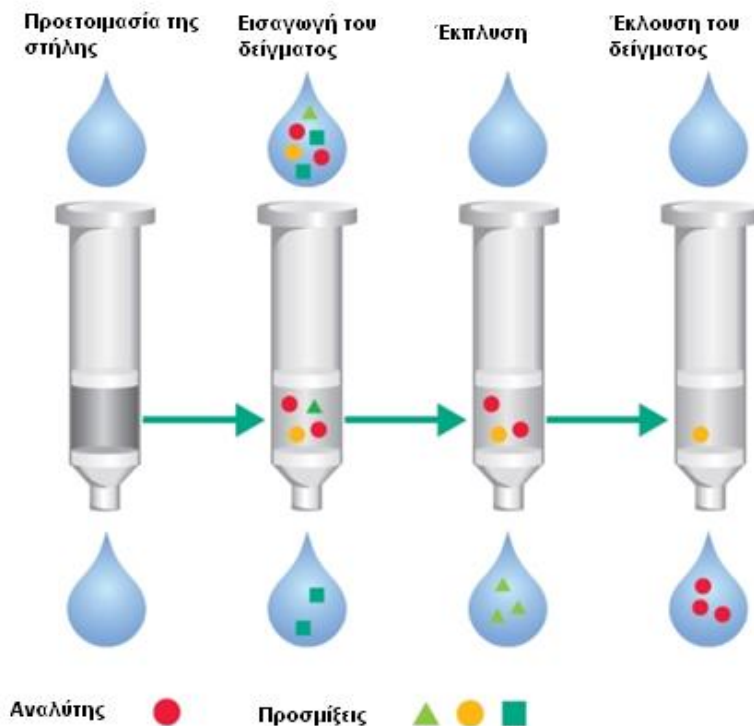
Στόχος είναι η ελαχιστοποίηση του αριθμού των σταδίων και η πιθανή αυτοματοποίηση της διαδικασίας της προκατεργασίας του δείγματος. Έτσι, μειώνεται ο συνολικά απαιτούμενος χρόνος, ο κόπος και οι πιθανότητες σφαλμάτων του αναλυτή. Η αυτοματοποίηση μιας διαδικασίας προκατεργασίας δείγματος μπορεί να είναι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

1.7.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Οι υπό προσδιορισμό ουσίες αλληλεπιδρούν με μία στερεή μήτρα και στη συνέχεια εκκλύονται με ισχυρό διαλύτη. Η έκλυση βασίζεται στην ισορροπία κατανομής μιας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων, που αναμειγνύονται ελάχιστα μεταξύ τους, και συναντάται σε πολλές και διαφορετικές εκδοχές ανάλογα με την φυσική κατάσταση του εκχυλιστικού μέσου και της φάσης δότη. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που οι αναλύτες δεν απομακρύνονται εύκολα από τη στερεή μήτρα, λόγω εγκλεισμού, οπότε και απαιτούνται πιο "ισχυρές" τεχνικές, όπως υπέρηχοι ή υγρή-στερεή εκχύλιση.

1.7.1.1. Εκχύλιση στερεής φάσης

Μία σημαντική τεχνική εκχύλισης-προκατεργασίας δείγματος είναι η εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) (Εικόνα 1.7.3). Η SPE χρησιμοποιεί ένα στερεό προσροφητικό υλικό ως εκχυλιστική φάση, η οποία εκχυλίζει οργανικές ενώσεις από υδατικά δείγματα [212-214]. Η απλότητα στο χειρισμό, η μικρή κατανάλωση οργανικών διαλυτών, η αποτελεσματική απομάκρυνση παρεμποδίζοντων συστατικών και η λιγότερο χρονοβόρα διαδικασία είναι τα κύρια χαρακτηριστικά της τεχνικής αυτής



Εικόνα 1.7.3. Εκχύλιση στερεής φάσης.

1.7.1.2. Εκχύλιση με ανάδευση

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

1.7.1.3. Εκχύλιση με χρήση υπερήχων

Η εκχύλιση με διαλύτη υποβοηθούμενη από υπερήχους, είναι μια σημαντική μεθοδολογία εκχύλισης, λόγω του χαμηλού κόστους της, τόσο σε εργαστηριακή όσο και σε βιομηχανική κλίμακα. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή το δείγμα, το οποίο είναι βυθισμένο μέσα σε διαλύτη, αναταράσσεται με τη βοήθεια υπερήχων για συγκεκριμένο χρόνο. Οι υπό προσδιορισμό ουσίες περνούν από τη στερεή φάση του

υποστρώματος του δείγματος στην υγρή φάση του διαλύτη λόγω της ανατάραξης. Ένας πιθανός μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο πραγματοποιείται η εκχύλιση με υπερήχους είναι αυτός της ενισχυμένης μεταφοράς μάζας, δηλαδή της αυξημένης διείσδυσης του διαλύτη στους πόρους του υποστρώματος με αποτέλεσμα τον “απεγκλωβισμό” των υπό προσδιορισμό ουσιών από τη στερεή φάση του υποστρώματος στον διαλύτη. Επιπλέον, οι υπερήχοι διευκολύνουν τη διόγκωση και την επιδιαλύτωση του υποστρώματος προκαλώντας διόγκωση των πόρων. Η αποτελεσματικότερη διόγκωση θα βελτιώσει και το ρυθμό μεταφοράς της μάζας και σε κάποιες περιπτώσεις θα συντελέσει στην καταστροφή του υποστρώματος, προκαλώντας έτσι αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης ή/και μείωση του απαιτούμενου χρόνου. Η παραπάνω διαδικασία συνήθως πραγματοποιείται εις τριπλούν και τα τελικά εκχυλίσματα συνδυάζονται και διηθούνται, ώστε να διαχωριστεί ο διαλύτης από το υπόστρωμα. Ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη ώστε να μειωθεί ο όγκος του. Άλλα πλεονεκτήματα της τεχνικής είναι η υψηλή επαναληψιμότητα και η δυνατότητα χρήσης δειγμάτων διαφορετικών μεγεθών.

1.7.2. Τεχνικές μικροεκχύλισης

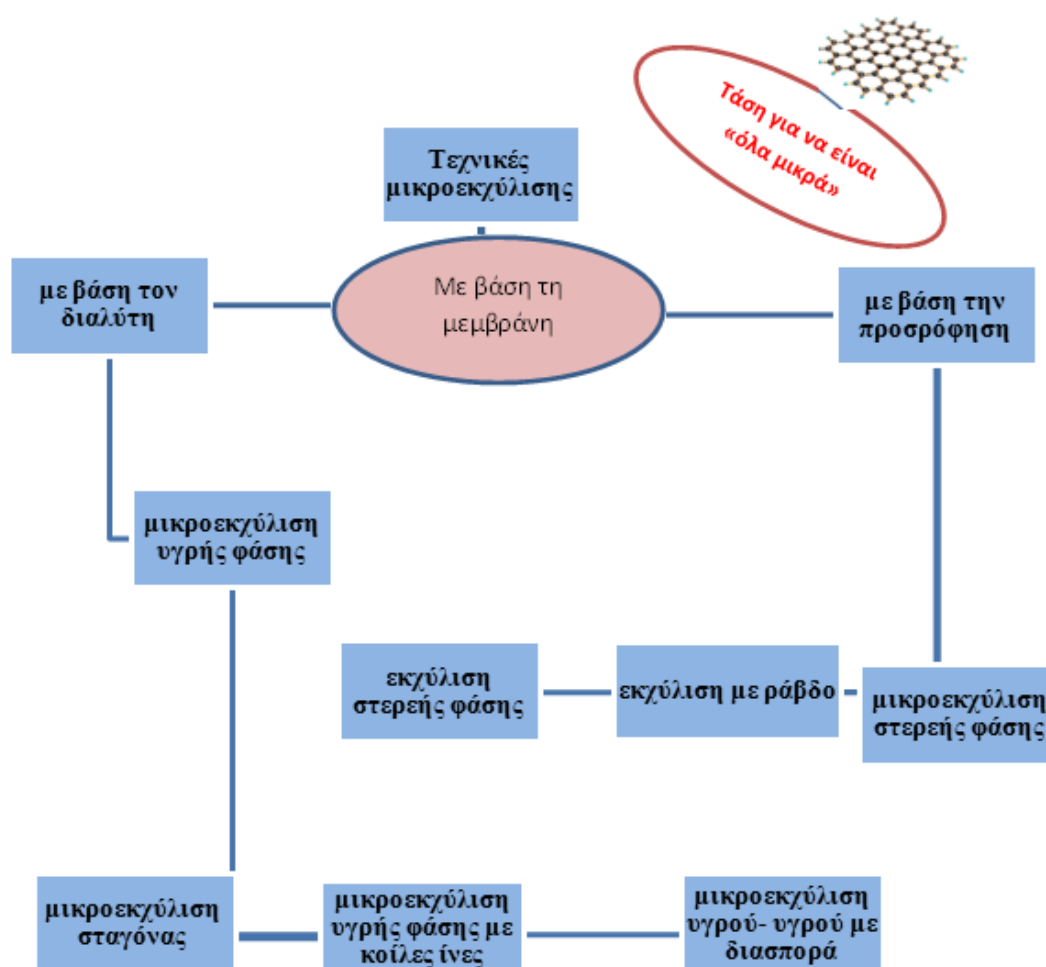
1.7.2.1. Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SOLID-PHASE MICROEXTRACTION – SPME)

Στις τρεις τελευταίες δεκαετίες, αναπτύχθηκε μία νέα τεχνική, η οποία ονομάζεται μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid-Phase MicroExtraction, SPME) και η οποία επιτυγχάνει μία εύκολη και αποτελεσματική προετοιμασία δείγματος [215, 229]. Η τεχνική αυτή εισήχθηκε από τον J. Pawliszyn και την ερευνητική του ομάδα στο Πανεπιστήμιο του Waterloo (Ontario, Canada) το 1989 και σήμερα είναι κοινώς αποδεκτή, με συνεχώς αυξανόμενες εφαρμογές. Η τεχνική SPME, έχει αποτελέσει μία από τις πιο συχνές εφαρμογές στο πεδίο της προκατεργασίας δειγμάτων πριν τη χημική ανάλυση. Η μικροεκχύλιση βασίζεται στη κλασική μέθοδο της εκχύλισης με τη διαφορά ότι αποτελεί μια μικρογραφία της SPE. Η μετατροπή των κλασικών τεχνικών εκχύλισης σε τεχνικές μικρής κλίμακας (miniaturized) ξεπέρασε πολλά προβλήματα που εμφανίζονταν κατά την ανάλυση (Εικόνα 1.7.4.).

Η τεχνική αυτή βασίζεται σε μια διαδικασία δύο σταδίων: α) οι προσδιοριζόμενες ενώσεις προσροφούνται σε μια λεπτή ίνα από τηγμένη πυριτία, η οποία είναι εμβαπτισμένη στο διάλυμα του δείγματος και β) οι ενώσεις εκροφώνται είτε με την τοποθέτηση της ίνας σε οργανικό διαλύτη είτε με θέρμανση. Επίσης, η

προσρόφηση είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί και από τον αέριο υπερκείμενο χώρο όταν πρόκειται για πτητικές ή αέριες ενώσεις.

Η εμφάνιση της SPME το 1990 αποτέλεσε σημείο αναφοράς στην εξέλιξη των τεχνικών μικροεκχύλισης. Η SPME διατηρεί όλα τα πλεονεκτήματα της SPE αλλά επίσης μειώνει ακόμα περισσότερο την ποσότητα των διαλυτών που χρησιμοποιούνται αλλά και του χρόνου εκρόφησης. Συντέλεσε στην ελαχιστοποίηση της απαιτούμενης ποσότητας του δείγματος και της ποσότητας της εκχυλιστικής φάσης, μειώνοντας έτσι το συνολικό κόστος [214, 228, 230].



Εικόνα 1.7.4. Τεχνικές μικροεκχύλισης στην ανάλυση

1.7.2.2. Μικροεκχύλιση στερεής φάσης βασισμένη σε μεμβράνη (Membrane-based solid-phase microextraction, MSPME)

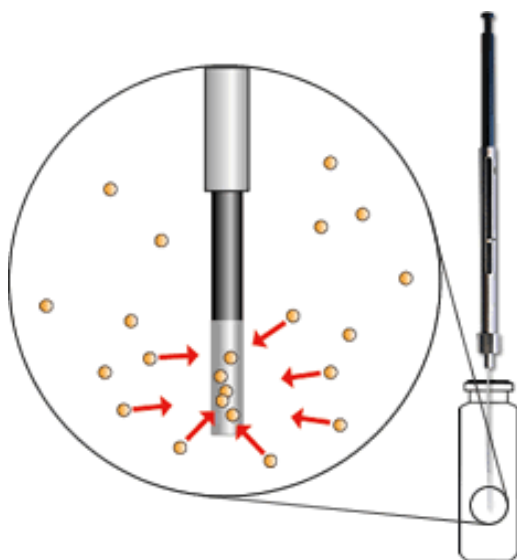
Η μικροεκχύλιση στερεής φάσης βασισμένη σε μεμβράνη, (Membrane-based solid-phase microextraction, MSPME) είναι μία τεχνική σχετικά νέα και απλή [231].

Περιλαμβάνει τη δειγματοληψία, την εκχύλιση και την προσυγκέντρωση σε ένα στάδιο και παρουσιάζει τα πλεονεκτήματα της SPME αλλά και του διαχωρισμού με μεμβράνη. Στην τεχνική αυτή, η μεμβράνη δρα ως φίλτρο στο οποίο δεσμεύονται εκλεκτικά τα μόρια της ένωσης ή γίνεται μεταφορά της ένωσης από το δείγμα (δότης) σε ένα διάλυμα (δέκτης) λόγω του φαινομένου της διάχυσης [216]. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό ενώσεων που βρίσκονται σε πολύπλοκες μήτρες, όπως τα βιολογικά δείγματα, χωρίς τη χρήση ειδικού εξοπλισμού, ακόμα και σε ιχνοποσότητες. Η MSPME βασίζεται στην κατακράτηση των αναλυτών στην μεμβράνη, ώστε η απόδοση της μεμβράνης να είναι ένα από τα κλειδιά που καθορίζουν την ευαισθησία και την εκλεκτικότητα της αναλυτικής μεθόδου [232, 233]. Λόγω των πλεονεκτημάτων της, όπως η απλή προετοιμασία, η εύκολη τροποποίηση και το χαμηλό κόστος, οργανικές και πολυμερείς μεμβράνες χρησιμοποιούνται ευρέως στην MSPME [234]. Σε σύγκριση με τα οργανικά και πολυμερή υλικά, τα ανόργανα υλικά, όπως η αλουμίνα ή διάφορα κράματα μετάλλων έχουν μεγάλη αντοχή, σχετικά μεγάλη αντίσταση στην τριβή και στην χημική και θερμική αποδόμηση και γι αυτό είναι καταλληλότερα για χρήση σε συνθήκες διαβρωτικού περιβάλλοντος και υψηλές θερμοκρασίες. Μάλιστα, υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον στη χρήση των ανόργανων μεμβρανών όπως, της τιτανίας [235, 236, 237, 238], της πυριτίας [154, 239], της ζirkονίας [151, 241] και της αλουμίνας [243, 244, 245]. Για το λόγο αυτό, οι μεμβράνες που παρασκευάζονται από ανόργανα υλικά έχουν χρησιμοποιηθεί από διαφορετικά επιστημονικά πεδία όπως, κατάλυση [246], αποθήκευση ενέργειας και ηλεκτρονική [247].

1.7.2.3. Μικροεκχύλιση στερεής φάσης με ίνες

Στις τελευταίες δεκαετίες, η τεχνολογία των μεμβρανών χρησιμοποιείται αρκετά στις διαδικασίες διαχωρισμού (Εικόνα 1.7.5.). Σημαντικό κομμάτι αποτελεί η κατασκευή διαφόρων πολυμερικών μεμβρανών κοίλων ινών, λόγω της μεγάλης τους επιφάνειας ανά μονάδα όγκου και της υψηλής τους εκλεκτικότητας. Ωστόσο, τα οργανικά υλικά είναι περιορισμένα στη χρήση τους λόγω της χαμηλής τους θερμικής σταθερότητας. Σε αντίθεση με αυτά, τα ανόργανα υλικά, όπως η αλουμίνα, έχουν υψηλή αντοχή στη χημική και θερμική επεξεργασία [248]. Για το λόγο αυτό, οι κοίλες ίνες που παρασκευάζονται από ανόργανα υλικά αναμένεται να έχουν καλύτερη αποδόση από τις πολυμερικές μεμβράνες. Έτσι, η σύνθεση των κοίλων ινών από

κεραμικά υλικά είναι ένα σημαντικό και ελκυστικό αντικείμενο στην ανάπτυξη και διαμόρφωση των μεμβρανών [231, 249].



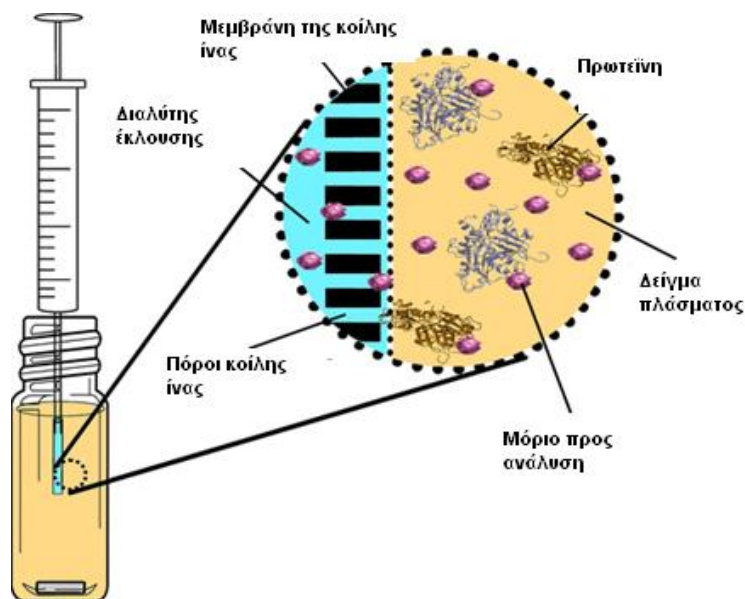
Εικόνα1.7.5. Συσκευή μικροεκχύλισης στερεής φάσης (SPME).

1.7.2.4. Προσροφητική εκχύλιση με κοίλη ίνα (Hollow fiber sorptive extraction - HFSE)

Η χρήση της κοίλης ίνας είναι μία τεχνική εκχύλισης στερεής φάσης (Hollow fiber sorptive extraction -HFSE). Με αυτήν αποφεύγονται διαδικασίες όπως φυγοκέντρωση ή απομόνωση, οι οποίες υπάρχουν αναγκαστικά στα υλικά με μορφή σωματιδίων. Είναι εύκολη στη χρήση, απαιτεί μικρή ποσότητα όγκου και κατανάλωση διαλυτών και επιτρέπει τον συνδυασμό της εκχύλισης, της προσυγκέντρωσης (enrichment) και του καθαρισμού (clean-up) σε ένα στάδιο. [241]. Ο όγκος και το εμβαδό της επιφάνειας της φάσης εκχύλισης του HFSE είναι μεγαλύτερη από αυτή των ινών στη SPME. Επιπλέον, στη HFSE μπορεί άμεσα να γίνει η εκχύλιση αναλυτών από τα υγρά δείγματα και στη συνέχεια να γίνει η εκρόφηση σε μικρόλιτρα διαλυτών και τέλος, η ανάλυση σε GC ή HPLC. Επίσης, η τεχνική αυτή είναι χρήσιμη στην ανίχνευση ενώσεων σε υδατικά δείγματα, για τις οποίες, υπό άλλες συνθήκες, μπορεί να χρειαζόταν πολύπλοκη προκατεργασία [235, 236]. Στις μέρες μας, τεχνικές που εφαρμόζονται για την παρασκευή ανόργανων κοίλων ινών είναι η υγρή/ξηρή νηματοποίηση (wet/dry spinning), η πυρόλυση των πολυμερικών κοίλων ινών ή μέθοδος με χρήση εκμαγείου και άλλες [231, 254]. Μεταξύ αυτών, η μέθοδος με εκμαγείο είναι σχετικά απλή και ευέλικτη στον έλεγχο του μεγέθους των κοίλων ινών [231]. Μάλιστα, συγκρινόμενη με άλλες μεθόδους, η

χρήση εκμαγείου είναι εύκολο να χρησιμοποιηθεί και το μέγεθος των κοίλων ινών που προκύπτουν μπορεί να ελεγχθεί εύκολα [249]. Ωστόσο, λίγες εργασίες έχουν πραγματοποιηθεί σε σχέση με την προσυγκέντρωση και το διαχωρισμό ενώσεων σε πραγματικά δείγματα. Οι Xu και Lee [241] παρασκεύασαν μεμβράνη κοίλη ίνας ζirkονίας και τη χρησιμοποίησαν επιτυχώς για την εκχύλιση του πινακολύλιου μεθυλοφωσφονικού οξέος (pinacolyl methylphosphonic acid), ενός προϊόντος αποδόμησης του soman.

Η σύνθεση κεραμικών υλικών όπως, πυριτίας, τιτανίας, ζirkονίας αλλά και σύνθετα αυτών, όπως τιτανίας-ζirkονίας έχουν παρασκευαστεί τα τελευταία χρόνια. Συγκεκριμένα, η τιτανία [231] και η ζirkονία είναι από τα πιο μελετημένα και χρησιμοποιημένα κεραμικά υλικά λόγω της αντοχής τους σε αλκαλικό περιβάλλον, είναι πρακτικά αδιάλυτα σε μεγάλο εύρος pH και εμφανίζουν εκπληκτική αντοχή σε υψηλή θερμοκρασία [235, 236, 249]. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων, έχουν ευρεία χρήση στην κατάλυση, στην οπτοηλεκτρονική, στη μετατροπή της ενέργειας, κ.α. Οι ίνες ζirkονίας, τιτανίας και τα σύνθετα υλικά ζirkονίας έχουν παρασκευαστεί επιτυχώς με τη βοήθεια διαφόρων εκμαγείων, όπως κυτταρίνης [250], νανοάνθρακα [251] οξειδίου του νικελίου [252] και μεμβράνης αλουμίνης [253]. Πρόσφατα, κοίλες ίνες πολυπροπυλενίου χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία για τη σύνθεση κοίλων ινών ζirkονίας [151, 241] και τιτανίας [237]. Οι ίνες αυτές έχουν τα χαρακτηριστικά δομής πορώδους μεμβράνης, με ομοιόμορφη υφή πόρων, καθώς και μεγάλη επιφάνεια [238] καθιστώντας την ίνα πολυπροπυλενίου ένα εύχρηστο και φθηνό εκμαγείο για τη σύνθεση κοίλων ινών διαφόρων κεραμικών υλικών.



Εικόνα 1.7.6. Μικροεκχύλιση στερεής φάσης με χρήση κοίλης ίνας

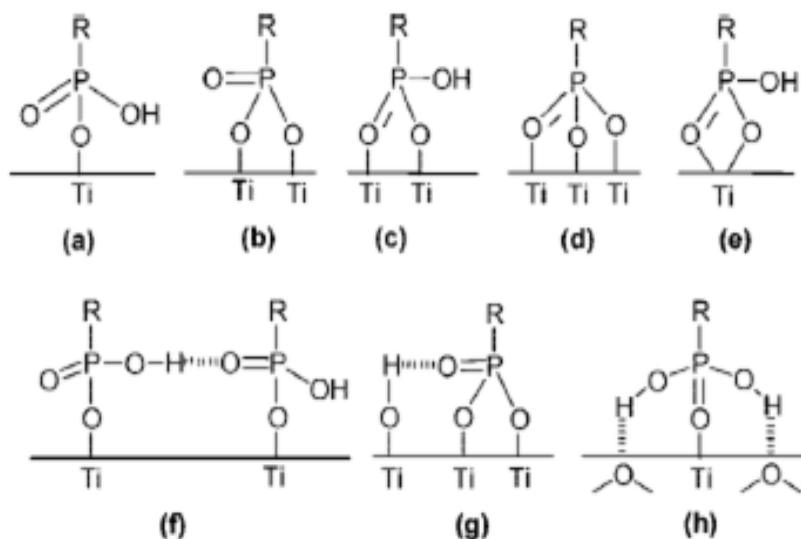
1.8. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΕΡΑΜΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΩΣΦΟΝΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ

Τα οργανοφωσφορικά παράγωγα, όπως φωσφονικά οξέα και αλκυλοφωσφονικά άλατα (alkylphosphates) προσελκύουν ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι δεσμεύονται ισχυρά από μία ευρεία ποικιλία οξειδίων του μετάλλου, όπως είναι η τιτανία, η ζirkονία, η αλουμίνα αλλά και σύνθετα αυτών όπως τιτανία-ζirkονία και αλουμίνα-τιτανία [25]. Τα οξείδια αυτά των μετάλλων είναι οξέα κατά Lewis και αντιδρούν με βάσεις κατά Lewis, όπως είναι οι φωσφονικές ομάδες σε οργανικά μόρια [257-263]. Τελευταία, οξείδια των μετάλλων όπως η τιτανία και η ζirkονία χρησιμοποιούνται ευρέως για την εκχύλιση πολλών οργανικών ενώσεων. Οι μονοστιβάδες φωσφονικού οξέος σε επιφάνειες διοξειδίου του τιτανίου έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα. Τα φωσφονικά οξέα χρησιμοποιούνται για την τροποποίηση μεμβρανών τιτανίας [255], τα αλκυλοφωσφονικά οξέα με μορφή μακράς αλυσίδας σχηματίζουν (well packed long-chain alkylphosphonic acid) μονοστιβάδες (self-assembled monolayers-SAMs) σε επιφάνειες τιτανίας με εξαιρετική θερμική και υδρολυτική σταθερότητα.

Τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας της ζirkονίας, η χημική και η θερμική της αντοχή, έχουν κάνει αρκετούς ερευνητές να τη μελετήσουν για την εκχύλιση ή/και την απομάκρυνση συστατικών από βιολογικά υποστρώματα [258, 264, 265]. Υπάρχουν αρκετές μελέτες στις οποίες γίνεται χρήση της ζirkονίας για την εκχύλιση

οργανοφωσφορικών ενώσεων. Ο Du και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μέθοδο SPE για οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα με χρήση νανοσωματιδίων ζιρκονίας τροποποιημένου ηλεκτροδίου [266]. Σε μια παρόμοια μελέτη, νανοσωματίδια ζιρκονίας αποτέλεσαν τη βάση για την κατασκευή ηλεκτροχημικού ανοσοαισθητήρα που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση φωσφορυλιωμένης ακετυλοχολινεστεράσης [267]. Όπως προαναφέρθηκε ήδη, τα φωσφονικά οξέα προσελκύουν το ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω της υψηλής τους συγγένειας με τις επιφάνειες οξειδίων των μετάλλων π.χ. της τιτανίας. Πράγματι, πειραματικές μελέτες σε κεραμικό υλικό τιτανίας έχουν δείξει τη δημιουργία ισχυρών και σταθερών δεσμών P-O-Ti που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της προσρόφησης του φωσφονικού οξέος στην επιφάνεια της τιτανίας [269]. Μέχρι σήμερα, λίγες μελέτες έχουν ασχοληθεί με τη φύση των δεσμών των φωσφονικών οξέων στην επιφάνεια των οξειδίων των μετάλλων και μάλιστα οι περισσότερες από αυτές αναφέρονται συγκεκριμένα για τους φωσφονικούς δεσμούς στην επιφάνεια της τιτανίας [256]. Οι δεσμοί που υφίστανται περιλαμβάνουν δεσμούς Ti-O-P και προκύπτουν από την ένωση μεταξύ P-OH και επιφανειακών ομάδων Ti-OH. Επίσης, έχουν προβλεφθεί γεφυρωμένες και χηλικές διαμορφώσεις, οι οποίες οδηγούν σε μια ποικιλία από μονο-, δι- και τριδοντικούς τρόπους δέσμευσης. Επιπλέον, κάποιες ομάδες P-OH και P=O είναι δυνατόν να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τις γειτονικές μονο- ή δισχιδείς φωσφονικές ομάδες, ή με την επιφάνεια υδροξυλίων ή οξο ομάδων [268].

Σημαντικό είναι το γεγονός ότι η αλληλεπίδραση των φωσφορικών ενώσεων με τα κεραμικά υλικά δεν επηρεάζει καθόλου την κρυσταλλική δομή και την σύσταση των κεραμικών υλικών [256, 270, 271]. Πιθανοί τρόποι αλληλεπίδρασης των φωσφονικών ομάδων με την τιτανία φαίνονται στο Σχήμα 1.8.1.

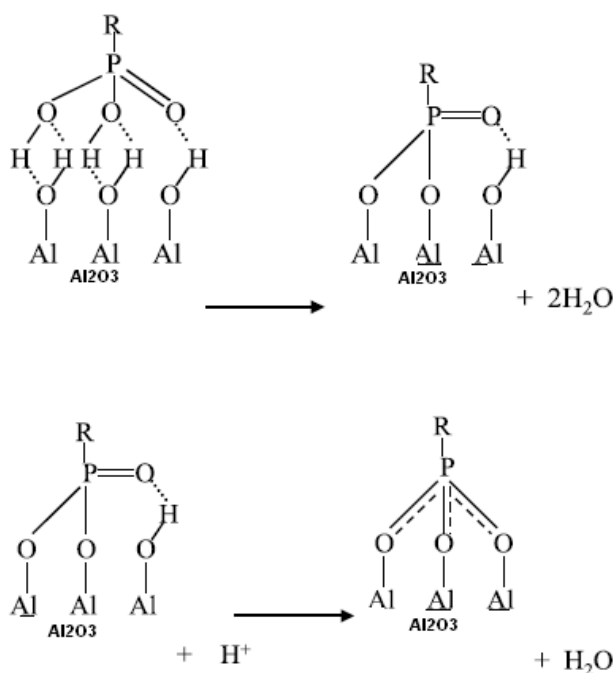


Εικόνα 1.8.1. Πιθανοί τρόποι δέσμευσης της τιτανίας με ομάδες φωσφονικού οξέος

Ο ακριβής τρόπος δέσμευσης (μονο-, δι-, ή τριδοντικός) της ομάδας του φωσφονικού οξέος στην επιφάνεια της τιτανίας δεν είναι εύκολο να εκτιμηθεί και μάλιστα, μελέτες που έχουν ασχοληθεί με τη φύση των δεσμών φαίνεται να είναι αντιφατικές. Έτσι, οι τρόποι που αλληλεπιδρούν τα φωσφονικά οξέα με την επιφάνεια της τιτανίας αλλά και των άλλων οξειδίων των μετάλλων είναι ακόμα υπό συζήτηση [255, 256, 269, 272-274]. Παρακάτω αναφέρονται μερικές τέτοιες περιπτώσεις: Με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας FT-IR, ο τριδοντικός δεσμός φαίνεται να είναι η πιο πιθανή δομή σύνδεσης των οργανοφωσφονικών οξέων με την τιτανία, λόγω της απουσίας ζωνών των P-OH και P=O [256]. Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτό έχει αμφισβητηθεί, δεδομένου ότι η ζώνη απορρόφησης της τιτανίας εμφανίζεται στην ίδια περιοχή. Οι ζώνες απορρόφησης από τους διάφορους τρόπους δόνησης του δεσμού P-O αλληλεπικαλύπτονται και εξαρτώνται από τον βαθμό ύπαρξης των δεσμών υδρογόνου ή του δεσμού μετάλλου. Πράγματι, έχει βρεθεί πειραματικά ότι οι δεσμοί υδρογόνου εμπλέκονται στη σύνδεση των φωσφονικών οξέων στην επιφάνεια της τιτανίας [275].

Σύμφωνα με μελέτη, με φασματοσκοπία NMR, υπάρχει ένα μίγμα από διδοντικούς και τριδοντικούς δεσμούς ανάμεσα στα φωσφονικά οξέα και την επιφάνεια της τιτανίας. Εκτός από τα σήματα που αποδίδονται στον τριδοντικό δεσμό, βρέθηκαν κάποια φασματοσκοπικά στοιχεία για ελλιπή αποπρωτονίωση του φωσφορικού οξέος το οποίο δείχνει ένα διδοντικό δεσμό [256]. Η παρουσία των δι- και τριδοντικών δεσμών φωσφονικών οξέων στην τιτανία ενισχύονται από πρόσφατες

μελέτες με XRD [270, 275]. Σύμφωνα με μελέτες του Nilsing και των συνεργατών του, σχετικά με την προσρόφηση του φωσφονικού οξέος στην επιφάνεια της ανατάσης (101) και του ρουτιλίου (110) της τιτανίας βρέθηκε ότι ο δεσμός των φωσφονικών ομάδων είναι διδοντικός [276]. Ο Hector και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι η προσρόφηση του βινυλοφωσφονικού οξέος εξαρτάται από την γεωμετρία του χώρου προσρόφησης και απέδειξαν ότι ευνοεί τριδοντικά σύμπλοκα, στα οποία η φωσφονική ομάδα είναι συνδεδεμένη με την επιφάνεια του οξειδίου του αργιλίου, μέσω τριών δεσμών P–O–Al (Εικόνα 1.8.2.) [272].



Εικόνα 1.8.2. Μονοπάτι αντίδρασης που οδηγεί σε τριδοντικό σύμπλοκο, σύμφωνα με τον Hector και τους συνεργάτες του.

1.9. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής είναι τριπλός και περιλαμβάνει:

1. Τη σύνθεση κοίλων κεραμικών ινών, οι οποίες είναι: αλουμίνα, τιτανία, ζirkονία, σταννία, πυριτία και σύνθετα αυτών: αλουμίνα-σταννία, αλουμίνα-τιτανία, τιτανία-ζirkονία.
2. Την ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου με στόχο την εκλεκτική εκχύλιση νουκλεοτιδίων από γάλα με χρήση κοίλων ινών και τον προσδιορισμό τους με HILIC-DAD.
3. Την ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου με στόχο την εκλεκτική εκλεκτική εκχύλιση επιλεγμένων φυτοφαρμάκων, που περιέχουν φωσφονικές ομάδες και αμινομάδες, από νερό επιφανειακό νερό με χρήση κοίλων ινών και τον προσδιορισμό τους με GC-MS.

Στο πρώτο μέρος της διατριβής παρασκευάζονται και χαρακτηρίζονται οι κεραμικές ίνες με τη μέθοδο sol-gel. Οι ίνες χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για μικροεκχυστικούς σκοπούς, τη μικροεκχύλιση και τον προσδιορισμό οργανοφωσφορικών ενώσεων περιβαλλοντικού και βιολογικού ενδιαφέροντος, λόγω του ότι τα οξείδια αυτά παρουσιάζουν εκλεκτικότητα σε οργανοφωσφορικές ενώσεις.

Στο δεύτερο μέρος, μελετάται η χρωματογραφική συμπεριφορά των νουκλεοτιδίων μεταβάλλοντας παραμέτρους, όπως είναι η στατική φάση, η ισχύς του διαλύτη έκλουσης, το pH της κινητής φάσης, η συγκέντρωση του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος, η φύση των οξέων, η φύση του οργανικού διαλύτη, η ροή της κινητής φάσης και η θερμοκρασία της στήλης. Με βάση τα πειραματικά δεδομένα γίνεται η επιλογή των καταλληλότερων συνθηκών και πραγματοποιείται η ανίχνευση νουκλεοτιδίων σε μητρικό γάλα και βρεφικό γάλα του εμπορίου, μετά από προσυγκέντρωσή τους με τη χρήση κοίλων ινών αλουμίνας και σταννίας.

Στο τρίτο μέρος, μελετάται η προσυγκέντρωση φυτοφαρμάκων σε κοίλες ίνες κεραμικών υλικών και η εκρόφηση των ενώσεων από τις ίνες εφαρμόζοντας στη συνέχεια αεριοχρωματογραφικό προσδιορισμό των παραγωγοποιημένων φυτοφαρμάκων. Στη συνέχεια, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε πραγματικό δείγμα από τη λίμνη των Ιωαννίνων (Παμβώτιδα).

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στο κεφάλαιο αυτό παρατίθενται αναλυτικά τα αντιδραστήρια, η προετοιμασία των κινητών φάσεων και των διαλυμάτων παρακαταθήκης, τα σκεύη και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Επίσης, περιγράφονται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά των στατικών φάσεων που χρησιμοποιούνται καθώς και η παρασκευή των κεραμικών ινών και οι επεξεργασίες των δειγμάτων για την προσυγκέντρωση των αναλυτών και καθαρισμό των δειγμάτων (clean up) κατά τον προσδιορισμό των νουκλεοτιδίων και επιλεγμένων φυτοφαρμάκων που περιέχουν στο μόριό τους φωσφονικές ομάδες και αμινομάδες.

2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΔΙΑΛΥΤΕΣ-ΥΛΙΚΑ

2.1.1. Αντιδραστήρια-Διαλύτες

- Τετρααιθόξυ σιλάνιο (TEOS, 99%), (Aldrich, Sigma–Aldrich Ltd., Greece)
- Νιτρικό οξύ (65%) (Merck, Schuchardt, Germany).
- Ένυδρος χλωριούχος κασσίτερος ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), (Fluka, Chemie, Buchs SG, Switzerland)
- Γλυκερόλη (99%, Sigma-Aldrich Hellas, Greece)
- Τριφθοροξικό οξύ ($\geq 98,0\%$, v/v) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Τριαιθυλαμίνη (TEA) ($\geq 99,5\%$, v/v) (Sigma-Aldrich Hellas, Greece).
- Βουτοξειδίο της ζirkονίας ($\text{Zr}(\text{OC}_4\text{H}_9)_4$), (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany)
- Βουτανόλη (Scharlau, Barcelona, Spain)
- Αιθανόλη (99,9%) (Lab-Scan, Dublin, Ireland)
- Ισοπροποξειδίο του τιτανίου ($\text{C}_{12}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{Ti}$), (Sigma-Aldrich Hellas, Greece).
- Ισοπροποξειδίου του αργιλίου (Sigma-Aldrich Hellas, Greece).
- 2,2,2 – τριφθοροαιθανόλη (TFE) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ανυδρίτης του τριφθοροξικού οξέος (TFAA) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- L-2-amino-4-hydroxymethyl phosphonoyl)butyryl-L-alanine (BIALAPHOS-BIAL) (purity 87.4%) είναι ευγενική προσφορά του φαρμακευτικού ερευνητικού κέντρου, Meiji Seika Kaisha (Tokyo, Japan).
- DL-homoalanine-4-yl-(methyl) phosphonic acid (GLUFOSINATE-GLUF) (Riedel de Haën, Seelze, Germany)

- N-(phosphonomethyl)glycine (GLYPHOSATE-GLYP) (Fluka, Chemie, Buchs SG, Switzerland)
- (1-aminopropyl)phosphonic acid (ampropylfos-AMPP) (Aldrich, Sigma–Aldrich Ltd., Greece)
- (1-aminobutyl)phosphonic acid (ABPA) (Aldrich, Sigma–Aldrich Ltd., Greece)
- Αμμωνία (25%, v/v, p.a.) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Ακετονιτρίλιο (ACN) (HPLC-grade, 99,9%) (Fisher Scientific, Leicester, UK)
- Υδροχλωρικό οξύ, HCl (37%, p.a.) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Οξικός αιθυλεστέρας (Scharlau, Barcelona, Spain)
- Ακετόνη (Lab-scan, Dublin, Ireland)
- Μεθανόλη (MeOH) (Fisher Scientific, Leicester, UK).
- Μυρμηκικό οξύ (Scharlau, Barcelona, Spain)
- Οξικό οξύ (>99,8%, w/w, p.a)(Fluka, Chemie, Buchs SG, Switzerland)
- Δινάτριο άλας της μονοφωσφορικής κυτοσίνης (CMP)(Sigma-Aldrich Hellas, Greece).
- Δινάτριο άλας της μονοφωσφορικής γουανοσίνης (GMP) (Sigma-Aldrich Hellas, Greece).
- Δινάτριο άλας της μονοφωσφορικής ουρακίλης (UMP) (Sigma-Aldrich Hellas, Greece).
- Δινάτριο άλας της μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany)
- Δινάτριο άλας της μονοφωσφορικής ινόςίνης (IMP) (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany).
- Μυρμηκικό αμμώνιο (97%, w/w) (Aldrich, Steinheim, Germany)
- Μυρμηκικό οξύ (98-100%, w/w, p.a.) (Scharlau, Barcelona, Spain)
- Οξικό αμμώνιο ($\geq 99,0\%$, w/w, HPLC) (Fluka Chemie, Buchs SG, Switzerland)
- Ισοπροπανόλη (99,9%) (Lab-Scan, Dublin, Ireland)
- Δις απεσταγμένο ύδωρ (DDW)

2.1.2. Υλικά

- Κοίλες ίνες πολυπροπυλενίου (Membrana, Wuppertal, Germany)
- Ήλιο, καθαρότητας 99,999%, για την απαέρωση της κινητής φάσης της HPLC και ως κινητή φάση στην αέρια χρωματογραφία
- Μικροσύριγγα όγκου 50 μL με επίπεδα κομμένη βελόνα (VICI, LA, USA)
- Μικροσύριγγα με λοξά κομμένη βελόνα (Hamilton, Switzerland) για εγχύσεις στον αέριο χρωματογράφο
- Μαγνητικές ράβδοι ανάδευσης, διαστάσεων 10 mm $\times$ 3 mm

➤ Φίλτρα νιτροκυτταρίνης, με διάμετρο πόρων 0,45 μm (Millipore Corporation, Billerica, MA 01821, USA) για διήθηση των υδατικών ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στη HPLC

➤ Μικροφίλτρα με μεμβράνη κυτταρίνης (0,45 μm) για τη διήθηση των δειγμάτων πριν την έγχυση στην HPLC (Spartan®, Schleicher & MicroScience, Dassel, Germany).

2.2. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ-ΚΙΝΗΤΕΣ ΦΑΣΕΙΣ

2.2.1. Διαλύματα

- Διαλύματα παρακαταθήκης των νουκλεοτιδίων AMP, CMP, GMP, UMP και IMP, συγκέντρωσης 1000 mg/L. Παρασκευάζονται με ζύγιση 10,0 mg στερεής ουσίας και διαλυτοποίηση σε 10 mL δις απεσταγμένο ύδατος εντός ογκομετρικής φιάλης χωρητικότητας 10 mL.

- Διαλύματα παρακαταθήκης των φυτοφαρμάκων και μεταβολιτών bialaphos, glufosinate, glyphosate, aminomethylphosphonic acid, (1-aminopropyl)phosphonic acid και (1-aminobutyl)phosphonic acid, συγκέντρωσης 1000 mg/L. Παρασκευάζονται με ζύγιση 10,0 mg στερεής ουσίας και διαλυτοποίηση σε 10 mL δις απεσταγμένο ύδατος εντός ογκομετρικής φιάλης χωρητικότητας 10 mL.

2.2.2. Κινητές φάσεις

➤ Οξέα

- Υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος, περιεκτικότητας 0,1% κατ' όγκο (v/v), pH 2,5: Παρασκευάζεται με ανάμιξη 0,250 mL πυκνού μυρμηκικού οξέος με δις απεσταγμένο ύδωρ εντός ογκομετρικής φιάλης χωρητικότητας 250 mL.

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

- Υδατικό διάλυμα οξικού οξέος περιεκτικότητας 0,1% κατ' όγκο (v/v), pH 3,8: Παρασκευάζεται με ανάμιξη 0,250 mL πυκνού οξικού οξέος με δις απεσταγμένο ύδωρ εντός ογκομετρικής φιάλης χωρητικότητας 250 mL.

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

- Υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος περιεκτικότητας 0,1% κατ' όγκο (v/v), pH 2,5: Παρασκευάζεται με ανάμιξη 0,250 mL πυκνού μυρμηκικού οξέος με δις απεσταγμένο ύδωρ εντός ογκομετρικής φιάλης χωρητικότητας 250 mL.
- Διάλυμα μυρμηκικού οξέος σε MeOH περιεκτικότητας 0,1% κατ' όγκο (v/v): Παρασκευάζεται με ανάμιξη 0,250 mL πυκνού μυρμηκικού οξέος με MeOH εντός ογκομετρικής φιάλης χωρητικότητας 250 mL.

➤ **Μυρμηκικό αμμώνιο / μυρμηκικό οξύ**

- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$, pH 5,0, συγκέντρωσης 10 mM: Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1576 g HCOONH_4 σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος. Στη συνέχεια, η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (0,140 mL) διαλύματος HCOOH 1,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$, συγκέντρωσης 10 mM: Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1576 g HCOONH_4 σε 25 – X mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος (X=0,140 mL) διαλύματος HCOOH 1,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$, pH 3,0, συγκέντρωσης 10 mM: Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1576 g HCOONH_4 σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος. Στη συνέχεια, η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (2,6 mL) διαλύματος HCOOH 5,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$, συγκέντρωσης 10 mM: Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1576 g HCOONH_4 σε 25 – X mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος (X=2,600 mL) διαλύματος HCOOH 5,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.

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

➤ **Οξικό αμμώνιο / οξικό οξύ / τριαιθυλαμίνη**

- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 10 mM, TEA 10 mM, pH 5.0: Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g HCOONH_4 σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος και προσθήκη 0.350 mL TEA. Στη συνέχεια η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (0,2900 mL) διαλύματος CH_3COOH 1,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.

- Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 10 mM, TEA 10μM: Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g HCOONH_4 σε 25 – X mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος ($X=2,9$ mL) διαλύματος CH_3COOH 1,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 10 mM, TEA 30 mM, pH 5.0: Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g HCOONH_4 σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος και προσθήκη 1,050 mL TEA. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ρύθμιση του pH με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (2,3 mL) διαλύματος CH_3COOH 5,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 10 mM, TEA 30μM: Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g HCOONH_4 σε 25 – X mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα ανακινείται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος ($X=2,3$ mL) διαλύματος CH_3COOH 5,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.
- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 10 mM, TEA 50 mM, pH 5.0: Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g HCOONH_4 σε ~200 mL δις απεσταγμένου ύδατος και προσθήκη 1,750 mL TEA. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ρύθμιση του pH με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου και με την προσθήκη κατάλληλου όγκου (3,7 mL) διαλύματος CH_3COOH 5,0 M, υπό ήπια ανάδευση. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή.
- Υδατο-οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ συγκέντρωσης 10 mM, TEA 50μM: Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 0,1927 g HCOONH_4 σε 25 – X mL δις απεσταγμένου ύδατος. Κατόπιν, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη όγκου 250 mL και προστίθενται ~200 mL ACN. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος ($X=3,7$ mL) διαλύματος CH_3COOH 5,0 M και ο όγκος συμπληρώνεται με ACN μέχρι τη χαραγή.

- ✓ Τα διαλύματα εργασίας των νουκλεοτιδίων παρασκευάζονται καθημερινά με αραιώση των διαλυμάτων παρακαταθήκης με την εκάστοτε κινητή φάση και με κατάλληλη αναλογία ACN/H₂O, ανάλογα με τις αρχικές συνθήκες έκλυσης.
- ✓ Τα διαλύματα των νουκλεοτιδίων και των φυτοφαρμάκων φυλάσσονται στους +4 °C.

2.3. ΟΡΓΑΝΑ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Το σύστημα περιλαμβάνει αντλία LC-20AD, με ενσωματωμένο μίκτη διαλυτών χαμηλής πίεσης, βρόχο δείγματος όγκου 20 μ L και χειροκίνητο Rheodyne σύστημα εισαγωγής δείγματος (7725i, Coati, CA, USA) και σύστημα θερμοστάτησης (oven) CTO-10ASvp. Για την απαέρωση των διαλυτών χρησιμοποιείται η συσκευή DGU-2A (Degasser) με παροχή ηλίου από οβίδα. Για την ανίχνευση των νουκλεοτιδίων χρησιμοποιείται ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (Diode Array Detector, DAD) SPD-M20A DAD. Τα δεδομένα συλλέγονται και επεξεργάζονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή στον οποίο είναι εγκατεστημένο το λογισμικό LC Solution, version 1.21. Όλες οι μονάδες της υγρής χρωματογραφίας και το πρόγραμμα συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων είναι της Shimadzu (Tokyo, Japan).
- Θερμοστατούμενος αναδευτήρας (Memmert, Memmert GmbH, Schwabach, Germany)
- Πεχάμετρο. Αποτελείται από ηλεκτρόδιο υάλου Ag / AgCl (Hamilton, Bonaduz AG, Switzerland), εφοδιασμένο με ηλεκτρονική συσκευή μέτρησης του pH (pH PHM83 AUTOCAL pH METER) (Radiometer, Copenhagen, Denmark).
- Συσκευή διπλής απόσταξης ύδατος (Aquatron, A4D, BIBBY Scientific Ltd., UK).
- Συσκευή διήθησης χωρητικότητας 1L (Millipore Corporation, Billerica, USA).
- Υδραντλία κενού (Büchi B-169, Switzerland).
- Αναλυτικός ζυγός (Shimadzu, Tokyo, Japan).
- Λουτρό υπερήχων (TRANSSONIC 420, Elma, Germany).
- Σύστημα αέριας χρωματογραφίας GC-17A συνδεδεμένο με φασματογράφο μάζας QP5000. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν και επεξεργάστηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με το πρόγραμμα GCMSsolution Ver. 1.0 Chromatography Software (Shimadzu Chem. Lab. Analysis System and Software). Όλες οι μονάδες του συστήματος και το πρόγραμμα συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων ήταν της εταιρίας Shimadzu (Kyoto, Japan). Η τριχοειδής στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν DB - 5MS (Agilent Technologies, CA, USA) μήκους 30 m, εσωτερικής διαμέτρου 0,250 mm και πάχους φιλμ 0,25 μ m.

- Για την μορφολογία των ινών χρησιμοποιείται σύστημα μικροσκοπίας ηλεκτρονιακής σάρωσης, (scanning electron microscopy, SEM), της JEM-2010F (JEOL Tokyo, Japan).
- Για την ταυτοποίηση των φάσεων των ινών που συντέθηκαν χρησιμοποιείται σύστημα περίθλασης ακτίνων X (*X-ray diffraction*, XRD) D8 Advance Bruker AXS (Madison, USA) κάνοντας χρήση ακτινοβολίας Cu K α .

2.4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΤΗΛΕΣ

2.4.1. Στήλη διολο-πυριτία

Η χρωματογραφική στήλη διολο-πυριτίας (HILIC-Diol column) φέρει ως υλικό πλήρωσης την πυριτία, η επιφάνεια της οποίας είναι επικαλυμμένη με διυδροξυπροπυλο-ομάδες. Το μήκος της στήλης που χρησιμοποιήθηκε είναι 15 cm, η εσωτερική διάμετρος 4,6 mm και το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης 5 μ m. Συνολικά η στήλη χαρακτηρίζεται ως ουδέτερη και χημικά σταθερή σε εύρος pH από 2,5 έως 7,0. Λεπτομερή χαρακτηριστικά της στήλης παρατίθενται στον Πίνακα 2.4.1.

2.4.2. Στήλη αμινο-πυριτία

Η χρωματογραφική στήλη αμινο-πυριτία φέρει ως υλικό πλήρωσης την πυριτία, η επιφάνεια της οποίας είναι επικαλυμμένη με αμινοπρόπυλο-ομάδες. Το μήκος της στήλης που χρησιμοποιήθηκε είναι 15 cm, η εσωτερική διάμετρος 4,6 mm και το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης 5 μ m. Η στήλη είναι χημικά σταθερή σε εύρος pH από 2,5 έως 7,0, ενώ στο εύρος αυτό του pH φέρει πλήρες θετικό φορτίο ($pK_a = 10,9$). Λεπτομερή χαρακτηριστικά της στήλης παρατίθενται στον Πίνακα 2.5.1.

2.4.3. Στήλη αμιδο-πυριτία

Η χρωματογραφική στήλη αμιδο-πυριτίας φέρει ως υλικό πλήρωσης την πυριτία, η επιφάνεια της οποίας είναι επικαλυμμένη με καρβαμυλο-ομάδες. Το μήκος της στήλης που χρησιμοποιήθηκε είναι 15 cm, η εσωτερική διάμετρος 4,6 mm και το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης 5 μ m. Συνολικά η στήλη χαρακτηρίζεται ως ουδέτερη και χημικά σταθερή σε εύρος pH από 2,5 έως 7,0. Λεπτομερή χαρακτηριστικά της στήλης παρατίθενται στον Πίνακα 2.4.1.

Πίνακας 2.4.1. Λεπτομερή χαρακτηριστικά των χρωματογραφικών στηλών (εταιρείας GL Sciences).

Χαρακτηριστικό	Διόλη-πυριτία	Αμινο-πυριτία	Αμιδο-πυριτία
Μέγεθος σωματιδίων	5 μm	5 μm	5 μm
Σχήμα σωματιδίων	σφαιρικό	σφαιρικό	σφαιρικό
Εμβαδόν επιφάνειας	450 m^2/g	450 m^2/g	450 m^2/g
Μέγεθος πόρων	100 Å	100 Å	100 Å
Όγκος πόρων	1,05 mL/g	1,05 mL/g	1,05 mL/g
Καθαρότητα πυριτίας	99,999%	99,999%	99,999%
Προσδεσμένη φάση	Διυδροξυπροπυλο-	Αμινοπρόπυλο-	Καρβαμούλο-
Ακροκάλυψη (end-capping)	ναι	όχι	όχι
Ποσοστό άνθρακα	20%	8%	18%
Εύρος pH χρήσης	2,0-7,5	2,0-7,5	2,0-7,5

2.4.4 Συνθήκες διαχωρισμού και ανίχνευσης με GC-MS

Ο προσδιορισμός των φυτοφαρμάκων και των μεταβολιτών γίνεται με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοφωτομετρία μάζας. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιείται στο σύστημα αέριου χρωματογράφου Shimadzu 17A, συνδεδεμένο με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας με ανιχνευτή μάζας επιλεγμένων ιόντων (MS-SIM) Shimadzu QP5000. Η διάρκεια της ανάλυσης είναι 35 min και ο όγκος του δείγματος έγχυσης 1 μL . Η θερμοκρασία του εισαγωγέα δείγματος και του ανιχνευτή ρυθμίστηκαν στους 250 °C και 280 °C αντίστοιχα. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται ήλιο (καθαρότητας 99,999%) με ροή 1,0 ml/min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα είναι (Πίνακας 2.4.2.): αρχική θερμοκρασία 60 °C για 2 min, αύξηση με ρυθμό 5 °C/min μέχρι τους 180 °C και αύξηση με ρυθμό 10 °C/min μέχρι τους 250 °C όπου παραμένει για 3 λεπτά. Ο φασματογράφος μάζας ενεργοποιήθηκε στο 6^{το} λεπτό μετά την έγχυση του δείγματος για να αποφευχθεί ο κορεσμός του ανιχνευτή από την παρουσία του διαλύτη. Για τον ιοντισμό των εκλούμενων ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (electron impact) στα 70 eV με τον ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή να λειτουργεί σε δυναμικό 1,30 kV. Όλες οι εγχύσεις έγιναν με κλειστή τη βαλβίδα-διαμοιραστή (splitless mode) ενώ μετά από 1 min η βαλβίδα άνοιξε με αναλογία 50:1.

Πίνακας 2.4.2. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα για τον διαχωρισμό των πρότυπων παραγωγοποιημένων ενώσεων με GC-MS.

ΡΥΘΜΟΣ, °C/min	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ, °C	ΧΡΟΝΟΣ, min
-	60.0	2.00
5.0	180.0	-
10.0	250	3.00

Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το GCMSSolution version 1.0 της εταιρίας Shimadzu.

2.5. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΚΟΙΛΩΝ ΚΕΡΑΜΙΚΩΝ ΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΛΥΜΑΤΟΣ-ΠΗΚΤΗΣ (SOL-GEL) ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥΣ

Αρχικά, παρασκευάζονται τα sols Al_2O_3 , SnO_2 , TiO_2 , ZrO_2 , SiO_2 , Al_2O_3 - TiO_2 , TiO_2 - ZrO_2 , στα οποία εμβαπτίζονται εν συνεχεία οι ίνες προπυλενίου.

2.5.1. Παρασκευές υδρολυμάτων (sols)

2.5.1.1. Παρασκευή υδρολύματος (sol) Al_2O_3

Ποσότητα ίση προς 2,55 g ισοπροποξειδίου του αργιλίου διαλυτοποιείται σε 12,5 mL δις απεσταγμένου ύδατος και υπό ανάδευση προστίθενται 400 μL πυκνού νιτρικού οξέος. Το διάλυμα που προκύπτει παραμένει υπό ανάδευση και υπό βρασμό με επαναρροή για τρεις ώρες στους 80°C , ώστε να σχηματιστεί το sol-gel.

2.5.1.2. Παρασκευή υδρολύματος (sol) SnO_2

Ποσότητα ίση προς 2,25 g ένυδρου χλωριούχου κασσίτερου διαλυτοποιείται σε 11 mL αιθανόλης και υπό ανάδευση προστίθενται 146 μL γλυκερόλης. Στη συνέχεια, διάλυμα αποτελούμενο από 11 mL αιθανόλης και 193 μL τριαιθυλαμίνης προστίθεται στάγδην στο παραπάνω διάλυμα και το διάλυμα που προκύπτει αφήνεται υπό ανάδευση για ώρα, ώστε να σχηματιστεί το sol-gel.

2.5.1.3. Παρασκευή υδρολύματος (sol) TiO_2

Σε ποτήρι ζέσεως αναμιγνύονται 4,5 mL αιθανόλης και 0,3 mL πυκνού οξικού οξέος και στο διάλυμα που προκύπτει προστίθενται 1 mL διαλύματος ισοπροποξειδίου του

τιτανίου και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 10 min, ώστε να σχηματιστεί το sol-gel. Η όλη διαδικασία γίνεται σε παγόλουτρο.

2.5.1.4. Παρασκευή υδρολύματος (sol) ZrO_2

3,58 mL βουτοξειδίου του ζirkονίου αναμιγνύεται με 5,5 mL βουτανόλης. Στη συνέχεια, υπό ανάδευση γίνεται ρύθμιση του pH στο 3 με τη βοήθεια πυκνού νιτρικού οξέος. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται σε παγόλουτρο. Στη συνέχεια, το διάλυμα που προκύπτει παραμένει υπό ανάδευση και υπό βρασμό με επαναρροή για πέντε ώρες, στους 70°C, ώστε να σχηματιστεί το sol-gel.

2.5.1.5. Παρασκευή υδρολύματος (sol) SiO_2

1 mL τετρααιθόξυ σιλάνιο αναμιγνύεται με 3,8 mL αιθανόλης. Στη συνέχεια, υπό ανάδευση προστίθεται στάγδην 0,085 mL πυκνού διαλύματος νιτρικού οξέος και 6,4 mL DDW. Το διάλυμα που προκύπτει παραμένει υπό ανάδευση και υπό βρασμό με επαναρροή για τρεις ώρες στους 80°C, ώστε να σχηματιστεί το sol-gel.

2.5.1.6. Παρασκευή υδρολύματος (sol) $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-TiO}_2$

1.0 g ισοπροποξειδίου του αργιλίου και 1 mL ισοπροποξειδίου του τιτανίου προστίθενται σε 3 mL προπανόλης. Στη συνέχεια, υπό ανάδευση αραιώνεται το παραπάνω διάλυμα με 5 mL δις απεσταγμένο νερό και γίνεται ρύθμιση του pH στο 2 με τη βοήθεια νιτρικού οξέος. Το διάλυμα που προκύπτει παραμένει υπό ανάδευση και υπό βρασμό με επαναρροή για 16 ώρες στους 80°C, ώστε να σχηματιστεί το sol-gel.

2.5.1.7. Παρασκευή υδρολύματος (sol) $\text{TiO}_2\text{-ZrO}_2$

1 mL βουτοξειδίου του ζirkονίου και 1 mL ισοπροποξειδίου του τιτανίου αναμιγνύονται με 12 mL βουτανόλης. Στη συνέχεια, υπό ανάδευση γίνεται ρύθμιση του pH στο 2 με τη βοήθεια νιτρικού οξέος. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται σε παγόλουτρο. Στη συνέχεια, το διάλυμα που προκύπτει παραμένει υπό ανάδευση και υπό βρασμό με επαναρροή για πέντε ώρες, στους 70°C, ώστε να σχηματιστεί το sol-gel.

2.5.2. Παρασκευή κοίλων κεραμικών ινών

Τα παραπάνω διαλύματα χρησιμοποιούνται για την επικάλυψη της πολυμερικής ίνας και τη σύνθεση των αντίστοιχων κεραμικών υλικών. Για το σκοπό αυτό ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

- Κοίλες ίνες πολυπροπυλενίου (template) μήκους 1 cm που έχουν προηγουμένως εκπλυθεί με ακετόνη σε λουτρό υπερήχων για 5 min, ώστε να αφαιρεθούν ακαθαρσίες των ινών, τοποθετούνται σε διηθητικό χαρτί για ξήρανση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Οι ίνες τοποθετούνται για μία ώρα στο αντίστοιχο sol-gel και τοποθετούνται σε λουτρό υπερήχων για μία ώρα
- Οι ίνες ξηραίνονται στους 120 °C, για μία ώρα.

Τα δύο τελευταία στάδια (εμβάπτιση και ξήρανση) επαναλαμβάνονται 2 με 3 φορές.

Στη συνέχεια, οι επικαλυμμένες ίνες φέρονται σε υψηλές θερμοκρασίες για την καύση του πολυπροπυλενίου και το σχηματισμό των αντίστοιχων κεραμικών φάσεων. Οι απαιτούμενες για το κάθε υλικό θερμοκρασίες είναι:

- Αλουμίνα: 1000 °C για 2 ώρες
- Στανία: 500 °C για 2 ώρες
- Τιτανία: 600 °C για 2 ώρες
- Ζirkονία: 600 °C για 2 ώρες
- Πυριτία: 600 °C για 2 ώρες
- Αλουμίνα- Τιτανία: 1000 °C για 2 ώρες
- Τιτανία- Ζirkονία: 600 °C για 2 ώρες

2.5.3. Χαρακτηρισμός των κεραμικών υλικών

Οι κεραμικές ίνες χαρακτηρίζονται με τις τεχνικές φασματοσκοπίας διασποράς ενέργειας ακτίνων-X (EDX), με περίθλαση ακτίνων X (XRD) και με μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM). Με την πρώτη τεχνική παρατηρούνται τα συστατικά και η αναλογία τους στην κεραμική ίνα. Με τη δεύτερη τεχνική παρατηρείται ο σχηματισμός των αντίστοιχων φάσεων των κεραμικών υλικών και με την τρίτη τεχνική αποτυπώνονται φωτογραφίες των κεραμικών ινών διαφόρων μεγεθύνσεων και από διάφορες γωνίες, όπου μπορούμε να διακρίνουμε την κοιλότητα των κεραμικών ινών.

2.5.4. Προσδιορισμός του σημείου μηδενικού φορτίου (point of zero charge-PZC) των κοίλων ινών με τη μέθοδο της προσθήκης άλατος

Το σημείο μηδενικού φορτίου των κοίλων ινών αλουμίνας, τιτανίας, ζirkονίας, στανίας, αλουμίνας-τιτανίας και τιτανίας-ζirkονίας προσδιορίζεται σε απαερωμένα διαλύματα 0,01M NaNO₃ στους 20 °C. Για την κάθε ίνα ακολουθείται η

παρακάτω πορεία: Σε ποτήρια ζέσεως τοποθετούνται από 30 mL του διαλύματος NaNO_3 και μία ίνα. Οι τιμές pH των διαλυμάτων ρυθμίζονται σε 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, χρησιμοποιώντας διαλύματα HNO_3 και NaOH . Το αρχικό pH του διαλύματος καταγράφεται με ένα μετρητή pH και κάθε φιάλη καλύπτεται με μεμβράνη και ανακινείται για 24 h. Καταγράφονται οι τελικές τιμές pH των διαλυμάτων και η διαφορά μεταξύ των αρχικών και τελικών pH - το λεγόμενο ΔpH - απεικονίζεται σε σχέση με τις αρχικές τιμές pH. Οι τιμές PZC υπολογίζονται από το ΔpH έναντι της περιοχής του pH και αντιστοιχεί σε pH όπου είναι $\Delta\text{pH} = 0$.

2.6. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΜΑΤΑΤΩΝ

2.6.1. Διατήρηση των δειγμάτων

Τα μητρικά γάλατα που προσφέρθηκαν από μητέρες που διένυαν το δεύτερο και τρίτο μήνα θηλασμού, διατηρούνται σε θερμοκρασία $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ και αφού αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος αναλύονται, ενώ τα δείγματα γάλακτος του εμπορίου είναι σε μορφή σκόνης και διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου. Το νερό της λίμνης που συλλέχθηκε τον Ιούνιο του 2014, διατηρείται σε θερμοκρασία $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ και αφού αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος χρησιμοποιείται για την ανάλυσή του.

2.6.2. Επεξεργασία δείγμα γάλακτος

2.6.2.1. Προετοιμασία δείγματος νουκλεοτιδίων

Τα μητρικά γάλατα ομογενοποιούνται με ήπια ανάδευση και 2,5 mL από κάθε δείγμα μεταφέρονται σε σωλήνες των 10 mL. Όσον αφορά τα εμπορικά δείγματα σε σκόνη, ποσότητα ίση με 0,25 g σκόνης γάλακτος μεταφέρεται σε σωλήνα των 10 mL και διαλυτοποιούνται με 2 mL δις απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια, προστίθεται σε κάθε δείγμα 1,0 mL οξικού οξέος (3% v/v) και μετά από ανάμειξη τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία για 15 min. Έπειτα, τα δείγματα αραιώνονται με δις απεσταγμένο νερό έως τελικό όγκο 5,0 mL και φυγοκεντρούνται σε 4000 rpm, για 10 min. Οι υπερκείμενες φάσεις χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για την διαδικασία της εκχύλισης.

2.6.2.2. Εκχύλιση των νουκλεοτιδίων από γάλα και έκλουση

Για την εκχύλιση των νουκλεοτιδίων, κεραμική ίνα μήκους 1-cm εμβαπτίζεται σε δείγμα των 2 mL και ανακινείται στα 300 rpm για 30 min, σε θερμοκρασία $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Μετά την εκχύλιση, η κεραμική ίνα προσεκτικά μεταφέρεται σε μεθανολικό διάλυμα αμμωνίας

1% και τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για την έκλυση των νουκλεοτιδίων. Στη συνέχεια, η ίνα αφαιρείται και το διάλυμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού κάτω από ήπιο ρεύμα αζώτου και επαναδιαλυτοποιείται στην κινητή φάση. Το διάλυμα που περιέχει τα νουκλεοτίδια διαβιβάζεται από μικροφίλτρο μεμβράνης κυτταρίνης για την κατακράτηση σωματιδίων και εγχέεται σε σύστημα HPLC-DAD για το διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση.

2.6.3. Επεξεργασία υδατικού δείγματος

2.6.3.1. Εκχύλιση των φυτοφαρμάκων από νερό λίμνης

Για την προσυγκέντρωση των φυτοφαρμάκων, μία κεραμική ίνα μήκους ~1 cm εμβαπτίζεται σε δείγμα των 50 mL και ανακινείται για 60 min. Στη συνέχεια, συλλέγεται προσεχτικά η κεραμική ίνα, τοποθετείται σε γυάλινο φιαλίδιο των 2 mL και εξατμίζεται μέχρι ξηρού κάτω από ήπιο ρεύμα αζώτου, ώστε να υποστεί παραγωγοποίηση.

2.6.3.2. Παραγωγοποίηση και εκρόφηση των φυτοφαρμάκων

Στο γυάλινο φιαλίδιο των 2 mL όπου υπάρχει η κεραμική ίνα με προσροφημένα τα φυτοφάρμακα προσθέτουμε 150 μ L TFE και 300 μ L TFAA. Το δείγμα τοποθετείται για 10 min σε λουτρό υπερήχων και στη συνέχεια σε ελαιόλουτρο θερμοκρασίας 90 °C, για 30 min. Ακολούθως, το δείγμα τοποθετείται πάλι σε ήπιο ρεύμα αζώτου ώστε να εξατμιστούν τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης μέχρι ξηρού. Μετά το τέλος της εξάτμισης, στο ξηρό υπόλειμμα προστίθενται 100 μ L οξικού αιθυλεστέρα. Το διάλυμα αναδεύεται καλά σε αναδευτήρα περιδίνησης, διαβιβάζεται από μικροφίλτρο με μεμβράνη κυτταρίνης για την κατακράτηση σωματιδίων και παραλαμβάνεται 1 μ L για έγχυση σε σύστημα GC-MS.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΟΙΛΩΝ ΚΕΡΑΜΙΚΩΝ ΙΝΩΝ

3.1.1.1. Σύνθεση κοίλων κεραμικών ινών

Για τη σύνθεση των κοίλων κεραμικών ινών, σημαντικό ρόλο παίζει η σύνθεση του sol και στη συνέχεια ο τρόπος κατασκευής των κοίλων ινών. Για το σκοπό αυτό ακολουθήθηκαν διάφορες πορείες, από τις οποίες έγιναν αποδεκτές αυτές που πληρούσαν συγκεκριμένες προϋποθέσεις. Το κριτήριο για την επιλογή των επιθυμητών ινών, σ' αυτή τη φάση της πειραματικής εργασίας, είναι: να είναι ακέραια η μορφή τους μετά την αποτέφρωσή, κατά το χειρισμό τους και κατά τη διάρκεια της αναλυτικής πορείας. Οι πορείες που ακολουθήθηκαν και οι λόγοι απόρριψης της κάθε πορείας εμφανίζονται στο πίνακα του παραρτήματος Α. Στον Πίνακα 3.1.1. αναγράφονται οι επιτυχημένες πορείες που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των κοίλων κεραμικών ινών.

Πίνακας 3.1.1. Προτεινόμενες πορείες για την σύνθεση κοίλων κεραμικών ινών

ΣΤΟΧΟΣ	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΡΕΙΑ	ΑΝΑΦΟΡΕΣ
ΚΕΡΑΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ			
Αλουμίνα	• 2,55g ισοπροποξειδίου του αργιλίου • 12,5 mL δις απεσταγμένου ύδατος • 400 μL πυκνού νιτρικού οξέος	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και reflux στους 80 °C, για 3 h. Κατασκευή ίνας με διαδοχικές εμβαπτίσεις στο λύμα και ξηράνσεις. Αποτέφρωση ίνας.	[277]
Τιτανία	• 1 mL ισοπροποξειδίου του τιτανίου • 4,5 mL αιθανόλη • 0,3 mL οξικού οξέος	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων σε παγόλουτρο και ανάδευση, για 10	Παραλλαγή του [277]

		min. Κατασκευή ίνας με διαδοχικές εμβαπτίσεις στο λύμα και ξηράνσεις. Αποτέφρωση ίνας.	
Ζιρκονία	• 3,58 mL βουτοξείδιο του ζιρκονίου • 5,5 mL βουτανόλη • Νιτρικό οξύ για pH 3	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και ανάδευση για 5 h σε reflux στους 70 °C. Κατασκευή ίνας με διαδοχικές εμβαπτίσεις στο λύμα και ξηράνσεις. Αποτέφρωση ίνας.	Παραλλαγή του [279]
Σταννία	• 2,25 g διένυδρο χλωριούχο κασσίτερο • 22 mL αιθανόλη • 1,5 mL γλυκερόλη • 192 μL τριαιθυλαμίνη	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και ανάδευση για 1 h. Κατασκευή ίνας με διαδοχικές εμβαπτίσεις στο λύμα και ξηράνσεις. Αποτέφρωση ίνας.	[280]
Πυριτία	• 1 mL τετρααιθόξυ σιλάνιο • 3,8 mL αιθανόλη • 6,4 mL δις απεσταγμένο νερό • 85 μL νιτρικό οξύ	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και ανάδευση σε reflux για 3 h. Κατασκευή ίνας με διαδοχικές εμβαπτίσεις στο λύμα και ξηράνσεις. Αποτέφρωση ίνας.	[281]

Αλουμίνα- Τιτανία	• 1 g ισοπροποξειδίο του αργιλίου • 1 mL ισοπροποξειδίο του τιτανίου • 3 mL προπανόλη • 5 mL δις απεσταγμένο νερό • νιτρικό οξύ για pH 2	Reflux υπό ανάδευση για 16h στους 80 °C. Κατασκευή ίνας με διαδοχικές εμβapτίσεις στο λύμα και ξηράνσεις. Αποτέφρωση ίνας.	[282]
Τιτανία- ζirkονία	• 1 mL ισοπροποξειδίο του τιτανίου • 1 mL βουτοξειδίο του ζirkονίου • 12 mL προπανόλη • HNO₃ pH 3	Reflux υπό ανάδευση σε reflux για 5 h στους 70 °C. Κατασκευή ίνας με διαδοχικές εμβapτίσεις στο λύμα και ξηράνσεις. Αποτέφρωση ίνας.	[279]

3.1.1.2. Αποτέφρωση κοίλων κεραμικών ινών

Οι ίνες που κατασκευάστηκαν αποτεφρώθηκαν σε θερμοκρασίες 500, 600, 800, 1000°C και με ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας 3, 5 και 10 °C/min. Οι ίνες τοποθετήθηκαν στο φούρνο, όταν αυτός βρισκόταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η θερμοκρασία αυξήθηκε σταδιακά στην επιθυμητή τιμή και οι ίνες παρέμειναν για 2 h στη θερμοκρασία αυτή για την πλήρη καύση της ίνας πολυπροπυλενίου και τη δημιουργία της κρυσταλλικής μορφής των κεραμικών υλικών. Η απομάκρυνση των ινών από το φούρνο πραγματοποιήθηκε μετά την πτώση της θερμοκρασίας. Στη συνέχεια, παρατηρήθηκαν οι ίνες που κατασκευάστηκαν και εφόσον πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια (§3.1.1.1.) επιλέχθηκαν οι ίνες των οποίων η αποτελεσματικότητα μελετήθηκε με πειράματα προσυγκέντρωσης νουκλεοτιδίων και επιλεγμένων φυτοφαρμάκων. Έτσι, οι ίνες που τελικά επιλέχθηκαν ως βέλτιστες, αποτεφρώθηκαν σε θερμοκρασίες με ρυθμούς αύξησης, που φαίνονται στον Πίνακα 3.1.2.

Πίνακας 3.1.2. Ρυθμός αύξησης θερμοκρασίας και τελικές θερμοκρασίες αποτέφρωσης κεραμικών κοίλων ινών

Οξείδια των μετάλλων	Θερμοκρασία καύσης (°C)	Ρυθμός αύξησης θερμοκρασίας (°C/min)
Αλουμίνη (Al_2O_3)	1000	10
Σταννία (SnO_2)	500	3
Πυριτία (SiO_2)	600	10
Τιτανία (TiO_2)	600	10
Ζιρκονία (ZrO_2)	600	10
Αλουμίνη (Al_2O_3)-Τιτανία (TiO_2)	1000	10
Τιτανία (TiO_2)-Ζιρκονία (ZrO_2)	600	10

Οι τελικές θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν για την αποτέφρωση των ινών έχουν σημασία στη κρυσταλλική μορφή που θα αποκτήσει το υλικό της κάθε κοίλης ίνας, ενώ ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας είναι σημαντικός για τη διατήρηση της μορφής των κοίλων ινών και την ανθεκτικότητα σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης. Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι για τη λήψη των ινών θα πρέπει η αύξηση της θερμοκρασίας του φούρνου να γίνεται σταδιακά παρουσία της ίνας, διαφορετικά οι ίνες που προκύπτουν είναι πιο εύθραυστες και συνεπώς ακατάλληλες για χρήση.

3.1.2. Χαρακτηρισμός κεραμικών υλικών

Τα κεραμικά υλικά που παρασκευάστηκαν χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία διασποράς ενέργειας ακτίνων-X, με περίθλαση ακτίνων X και μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων.

3.1.2.1. Φασματοσκοπία διασποράς ενέργειας ακτίνων-X (Energy-dispersive X-ray spectroscopy-EDX)

Τα αποτελέσματα από τη φασματοσκοπία διασποράς ενέργειας ακτίνων X δίνονται στο Παράρτημα Δ. Στα γραφήματα αυτά παρατηρούνται τα συστατικά και η αναλογία τους στην κάθε κεραμική ίνα. Παρατηρείται ότι οι ίνες που παρασκευάστηκαν αποτελούνται από τα επιθυμητά συστατικά, ενώ η ίνα αλουμίνας-σταννίας είναι εμφανές ότι δεν έχει παρασκευαστεί επιτυχώς, αφού παρουσιάζει μεγάλο ποσοστό σε κασσίτερο και πολύ μικρό ποσοστό σε αργίλιο.

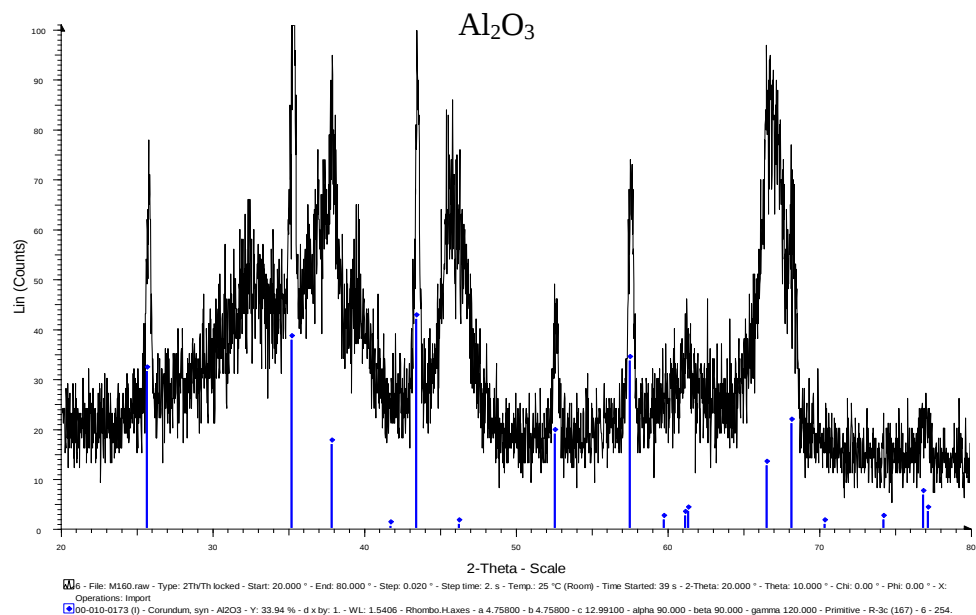
3.1.2.2. Περίθλαση ακτίνων X (X-ray diffraction analysis -XRD)

3.1.2.2.1. Περιθλασίγραμμα του κεραμικού υλικού αλουμίνας

Η αλουμίνα είναι ένα υλικό το οποίο υφίσταται σε διάφορες μορφές, όπως χ , κ , γ , δ , η , θ αλλά και στη σταθερή δομή α . Μάλιστα, ο σχηματισμός της α -αλουμίνας πραγματοποιείται μέσω των άλλων μορφών της αλουμίνας, με κυριότερες τις γ , δ και θ , οι οποίες μπορεί να είναι ταυτόχρονα παρούσες [283, 284]. Συγκεκριμένα, οι μετασχηματισμοί που λαμβάνουν χώρα στην αλουμίνα και μπορούν να μετατραπούν από τη μία μορφή στην άλλη σε θερμοκρασίες 500, 800, 900 και 1100°C αντίστοιχα είναι οι παρακάτω [284]:



Στο Σχήμα 3.1.1. δίνεται το περιθλασίγραμμα της α -αλουμίνας, αποτεφρωποιημένης στους 1000°C. Όλες οι κορυφές συμφωνούν με το σχηματισμό αλουμίνας με κάποιες από τις χαρακτηριστικές κορυφές σύμφωνα με τη βιβλιογραφία να είναι (20): 25, 35, 43, 52 και 58 [277, 284, 285, 286, 287, 288, 289]. Επίσης, σύμφωνα με το περιθλασίγραμμα στους 1000 °C, υπάρχει κορούνδιο αλουμίνας (α - Al_2O_3), χωρίς να εμφανίζεται κάποια άλλη κρυσταλλική φάση όπως γ -, δ - ή θ -αλουμίνα.

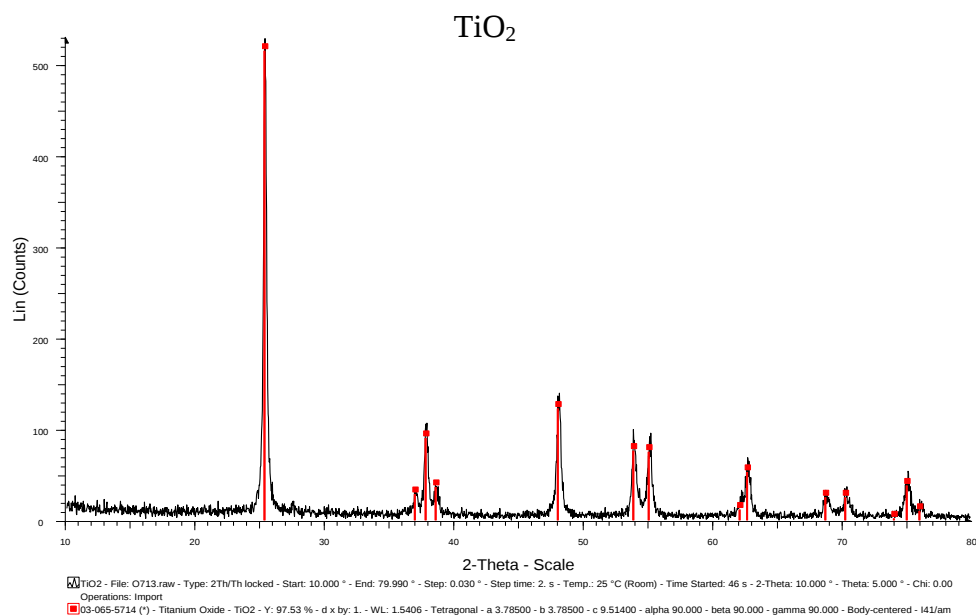


Σχήμα 3.1.1. Περιθλασίγραμμα (XRD) του κεραμικού υλικού της αλουμίνας

3.1.2.2.2. Περιθλασίγραμμα του κεραμικού υλικού τιτανίας

Η τιτανία είναι ένα κεραμικό υλικό το οποίο υφίσταται στη φύση με δύο κύριες μορφές: τον ανατάση (anatase) και το ρουτίλιο (rutile), με την πρώτη να μετατρέπεται σε ρουτίλιο σε θερμοκρασία 700 °C [290].

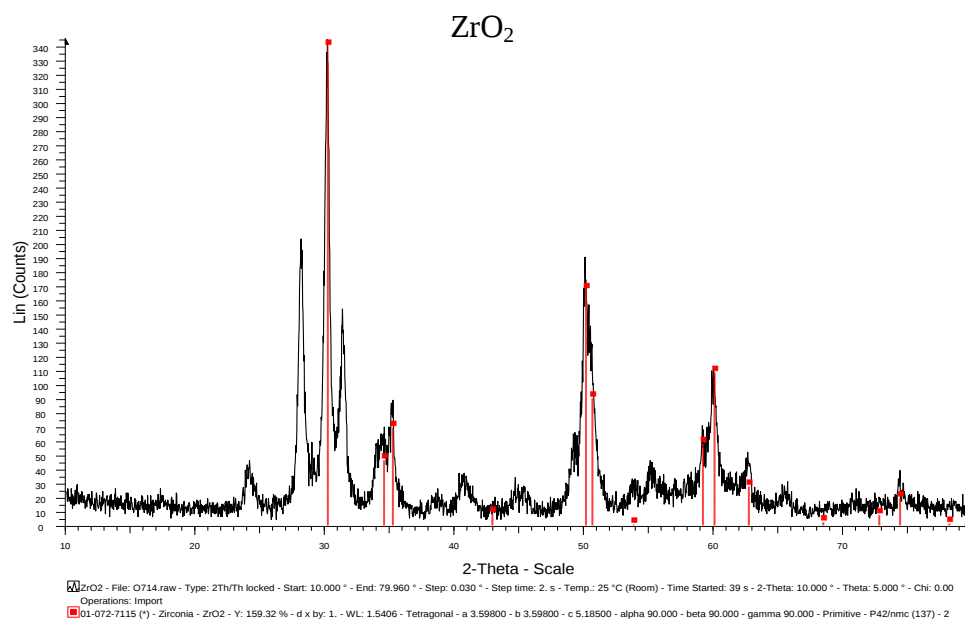
Στο Σχήμα 3.1.1 δίνεται το περιθλασίγραμμα τιτανίας αποτεφροποιημένης στους 600°C. Όλες οι κορυφές συμφωνούν με το σχηματισμό τιτανίας, με κάποιες από τις χαρακτηριστικές κορυφές σύμφωνα με τη βιβλιογραφία να είναι (2θ): 25, 34, 35, 36, 48, 54, 55 [278, 279, 290, 291, 292]. Όσον αφορά την κρυσταλλική μορφή της τιτανίας, το περιθλασίγραμμα αποκαλύπτει ότι στους 600°C υπάρχει η μορφή του ανατάση.



Σχήμα 3.1.2. Περιθλασίγραμμα (XRD) του κεραμικού υλικού της τιτανίας

3.1.2.2.3. Περιθλασίγραμμα του κεραμικού υλικού ζirkονίας

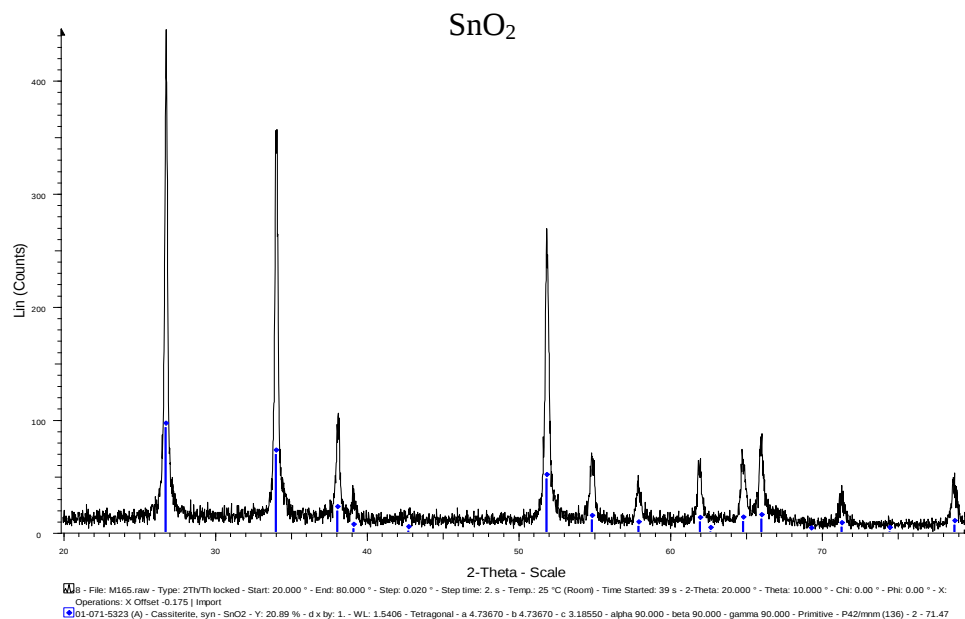
Η ζirkονία είναι γνωστή με τρεις μορφές, την μονόκλινη (monoclinic), την τετραγωνική (tetragonal) και την κυβική (cubic). Στο Σχήμα 3.1.3. παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές γωνίες της ζirkονίας και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι οι εξής (2θ): 30, 35, 36, 50, 51, 59, 60 [278, 293, 294]. Σύμφωνα με το περιθλασίγραμμα, στους 600°C όπου πραγματοποιείται η καύση, υφίσταται η μορφή της τετραγωνικής ζirkονίας [280].



Σχήμα 3.1.3. Περιθλασίγραμμα (XRD) του κεραμικού υλικού της ζirkονίας

3.1.2.2.4. Περιθλασίγραμμα του κεραμικού υλικού σταννίας

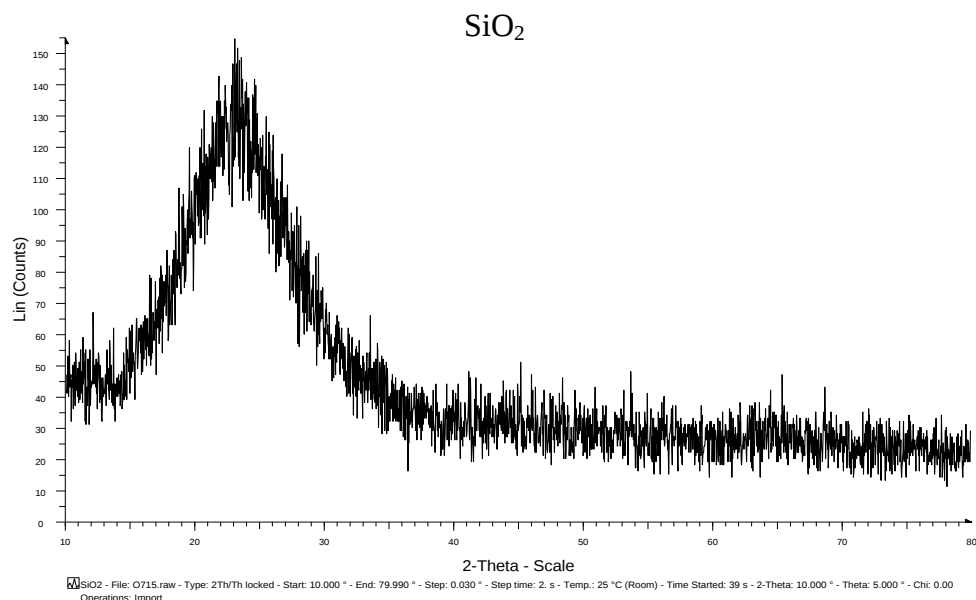
Στο Σχήμα 3.1.4 φαίνεται το περιθλασίγραμμα της σταννίας και παρατηρείται η κρυσταλλική δομή ίνας σταννίας που υπέστη καύση στους 500 °C. Οι χαρακτηριστικές κορυφές, οι οποίες είναι (2θ): 27, 34, 38, 52, 55, 58, 62, 65, 66, φανερώνουν την ύπαρξη κρυσταλλικής φάσης της καθαρής σταννίας και απουσία άλλης μορφής, όπως Sn, SnO, SnO_x [152, 296, 297, 298, 299]. Μάλιστα, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η σταννία αποκτά κρυσταλλική μορφή από τους 300° C ενώ όλες οι αντιδράσεις στο σύστημα ολοκληρώνονται πριν τους 600°. Τέλος, σε θερμοκρασίες ψηλότερες από τους 600 °C δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στην κρυσταλλική δομή της σταννίας [280, 300, 301].



Σχήμα 3.1.4. Περιθλασίγραμμα (XRD) του κεραμικού υλικού της σταννίας

3.1.2.2.5. Περιθλασίγραμμα του κεραμικού υλικού πυριτίας

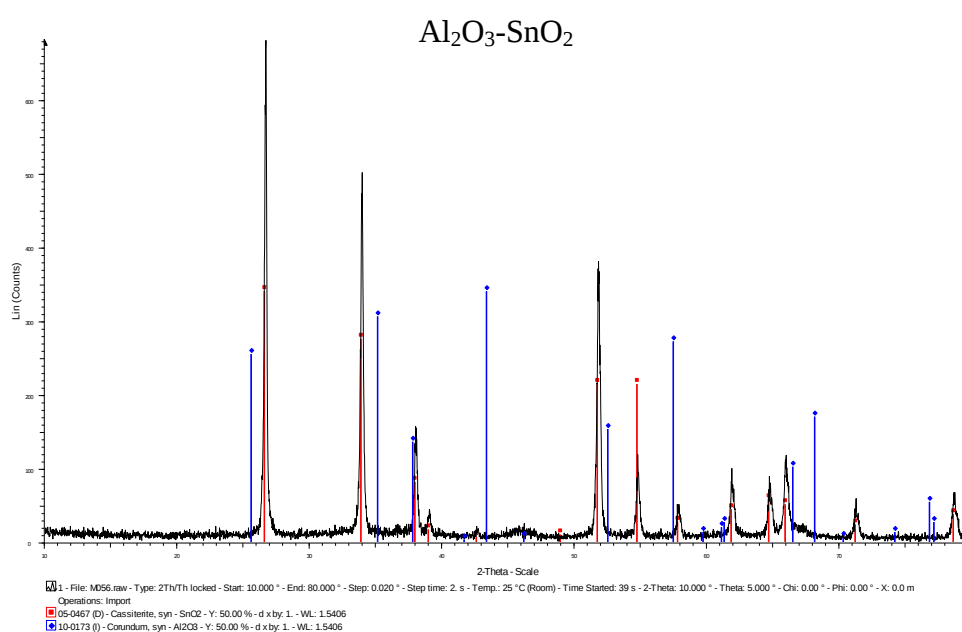
Στο Σχήμα 3.1.5 παρατηρείται το περιθλασίγραμμα της άμορφης πυριτίας με τη χαρακτηριστική της κορυφή στις $(2\theta) 23^\circ$.



Σχήμα 3.1.5. Περιθλασίγραμμα (XRD) του κεραμικού υλικού της πυριτίας

3.1.2.2.6. Περιθλασίγραμμα του κεραμικού υλικού αλουμίνας-σταννίας

Στο Σχήμα 3.1.6. παρατηρείται το υλικό με τις χαρακτηριστικές κορυφές μόνο της σταννίας, που σημαίνει ότι το σύνθετο υλικό αλουμίνας-σταννίας δε σχηματίζεται. Τα υλικά της αλουμίνας και της σταννίας είναι ασύμβατα μεταξύ τους για να κατασκευαστεί το σύνθετο υλικό αλουμίνας-σταννίας. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η σύνθεση του σύνθετου αυτού κεραμικού υλικού παρουσιάζεται να είναι εφικτή με τη μέθοδο sol-gel [334], με χρήση αυτόκλειστου [335] και με βάση μια διεθνή πατέντα [336]. Όμως οι πορείες που δοκιμάστηκαν στο εργαστήριο για την κατασκευή της ίνας δεν έδωσαν το επιθυμητό αποτέλεσμα.

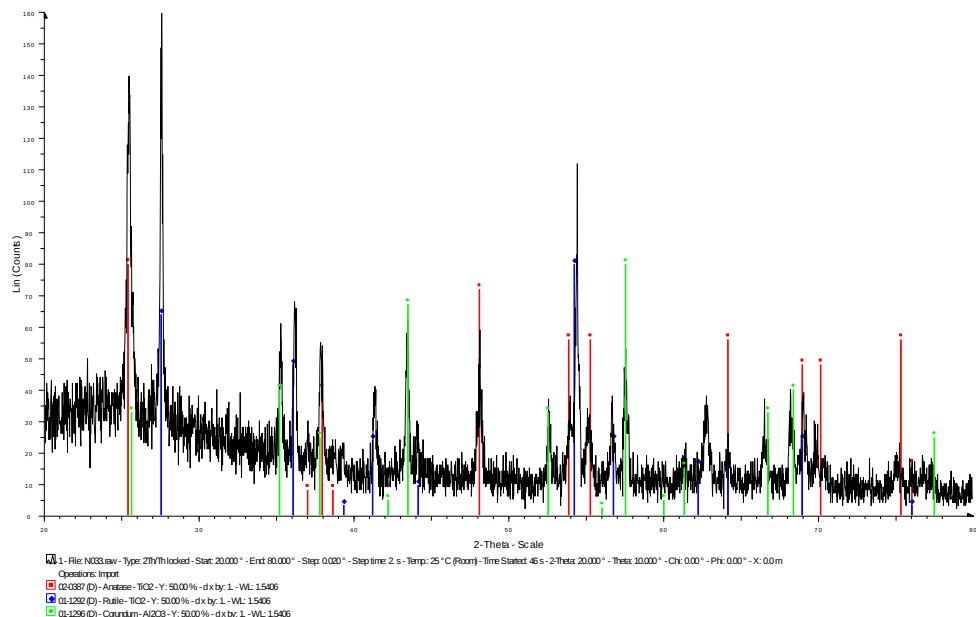


Σχήμα 3.1.6. Περιθλασίγραμμα (XRD) του κεραμικού υλικού της αλουμίνας-σταννίας

3.1.2.2.7. Περιθλασίγραμμα του κεραμικού υλικού αλουμίνας-τιτανίας

Στο Σχήμα 3.1.7. παρατηρείται το περιθλασίγραμμα της σύνθετης κεραμικής ίνας αλουμίνας-τιτανίας. Η τιτανία εμφανίζεται με δύο μορφές, το ρούτιλιο και τον ανατάση.

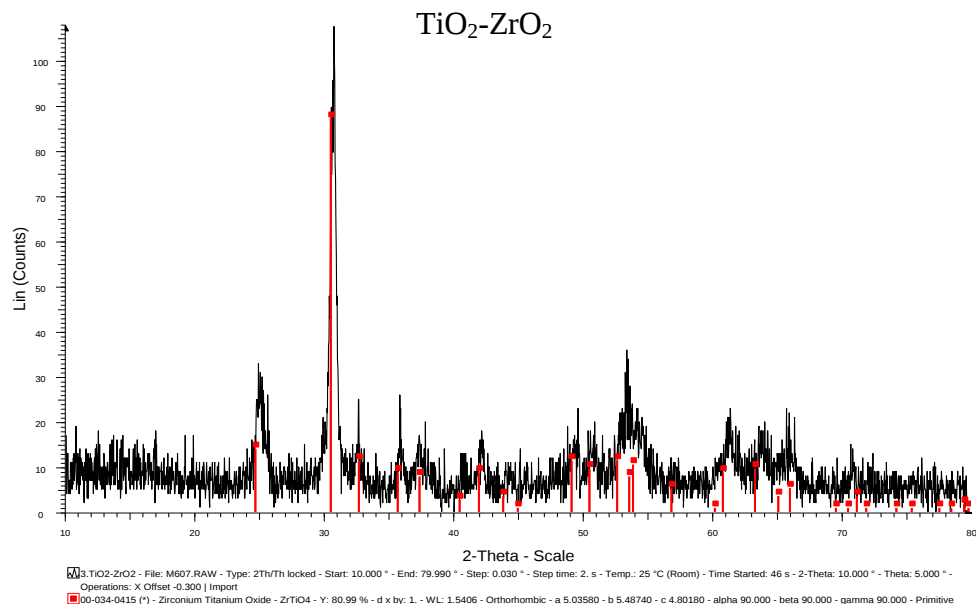
$\text{Al}_2\text{O}_3\text{-TiO}_2$



Σχήμα 3.1.7. Περιθλασίγραμμα (XRD) του κεραμικού υλικού της αλουμίνας-τιτανίας

3.1.2.2.8. Περιθλασίγραμμα του κεραμικού υλικού τιτανίας-ζirkονίας

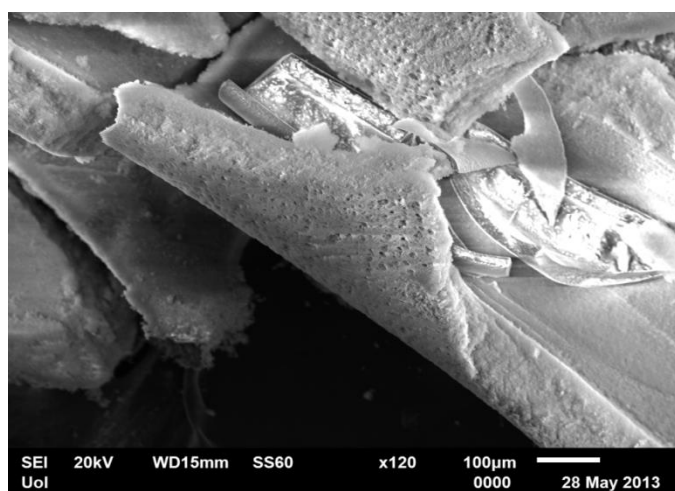
Στο Σχήμα 3.1.8. φαίνεται το περιθλασίγραμμα της σύνθετης κεραμικής ίνας τιτανίας-ζirkονίας. Παρατηρείται ότι το περιθλασίγραμμα αντιστοιχεί στο σύνθετο υλικό ZrTiO_4 , με χαρακτηριστικές κορυφές, οι οποίες είναι (2θ): 25, 30, 32, 49, 50.



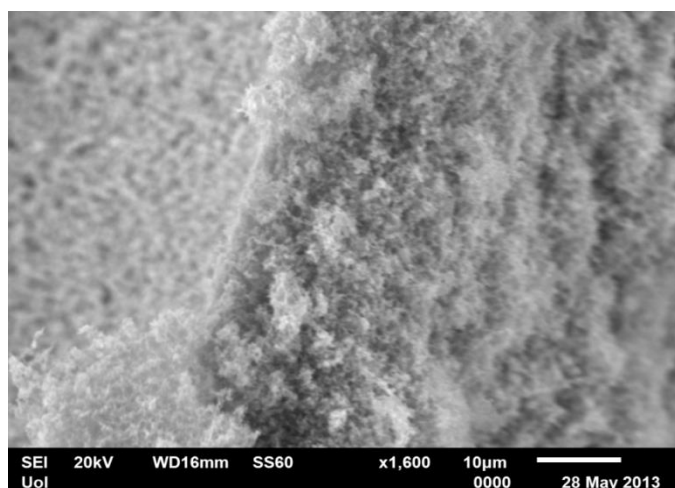
Σχήμα 3.1.8. Περιθλασίγραμμα (XRD) του κεραμικού υλικού της τιτανίας-ζirkονίας

3.1.2.3. Μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων (Scanning electron microscopy-SEM)

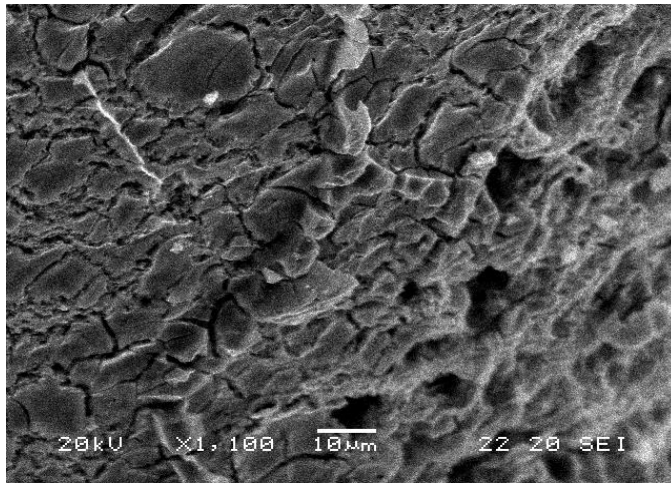
Οι εικόνες που λήφθηκαν από το SEM δείχνουν τις μορφολογίες των κοίλων ινών των κεραμικών υλικών, σε διαφορετικές μεγεθύνσεις και οπτικές γωνίες, φανερώνοντας τον κοίλο χαρακτήρα και το πορώδες των τοιχωμάτων τους. Το πάχος του τοιχώματος του μεταλλικού οξειδίου κοίλων ινών είναι 100-120 μm , για κάθε κεραμικό υλικό. Οι ίνες είναι πορώδεις, γεγονός που ευνοεί την βελτίωση της εκχυλιστικής τους ικανότητας μιας και αυτός είναι και ο σκοπός της σύνθεσης των υδρόφιλων αυτών υλικών (Σχήματα 3.1.9- 3.1.15).



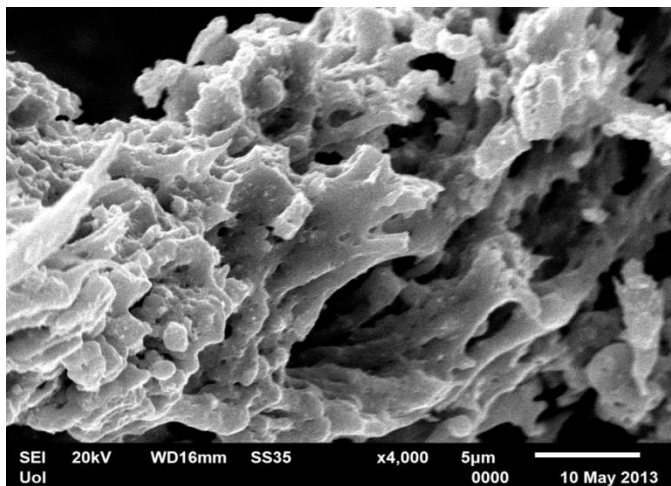
Σχήμα 3.1.9. SEM του κεραμικού υλικού της αλουμίνιας



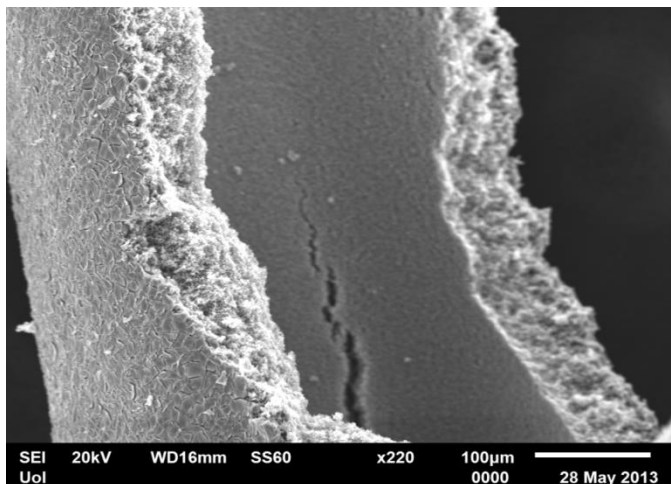
Σχήμα 3.1.10. SEM του κεραμικού υλικού της τιτανίας



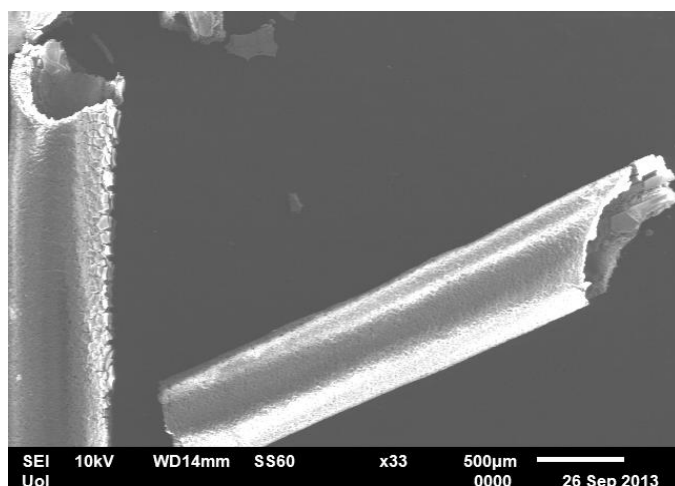
Σχήμα 3.1.11. SEM του κεραμικού υλικού της ζιρκονίας



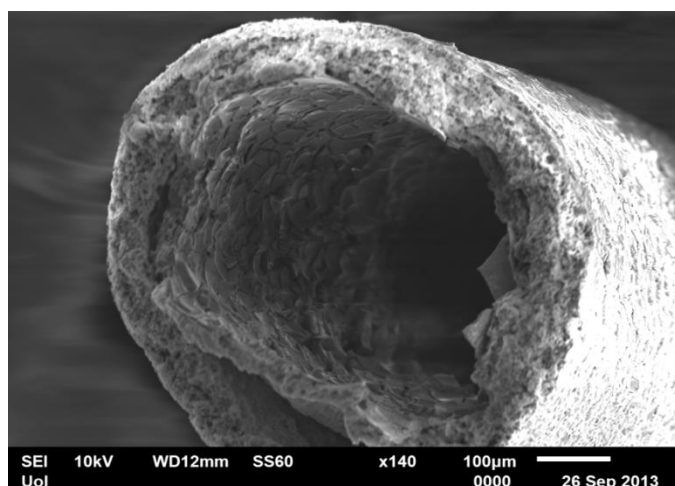
Σχήμα 3.1.12. SEM του κεραμικού υλικού της σταννίας



Σχήμα 3.1.13. SEM του κεραμικού υλικού της πυριτίας



Σχήμα 3.1.14. SEM του κεραμικού υλικού της αλουμίνας-τιτανίας



Σχήμα 3.1.15. SEM του κεραμικού υλικού της τιτανίας-ζιρκονίας

3.1.3. Προσδιορισμός του σημείου μηδενικού φορτίου (point of zero charge-pzc)

Τα σημεία μηδενικού φορτίου των ινών προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τη μεθοδολογία της παραγράφου 2.5.4. και οι τιμές κυμαίνονται από 5,6 έως 7,0 για τα κεραμικά υλικά, όπως δίνονται στον Πίνακα 3.1.3.1.

Πίνακας 3.1.3.1. Τιμές του σημείου μηδενικού φορτίου των υλικών

Κεραμικές κούλες ίνες	Al_2O_3	TiO_2	ZrO_2	SnO_2	Al_2O_3 - TiO_2	TiO_2 - ZrO_2
Σημείο μηδενικού φορτίου	6,2	7,0	6,8	5,9	5,6	6,2

3.2. ΕΚΛΕΚΤΙΚΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΓΑΛΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΟΙΛΩΝ ΙΝΩΝ ΑΛΟΥΜΙΝΑΣ ΚΑΙ ΣΤΑΝΝΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΜΕ HILIC-DAD

Οι κοίλες ίνες αλουμίνας, τιτανίας, ζirkονίας, σταννίας, πυριτίας, αλουμίνας-τιτανίας και τιτανίας-ζirkονίας χρησιμοποιήθηκαν για την προσυγκέντρωση των νουκλεοτιδίων και των φυτοφαρμάκων. Συγκεκριμένα, για τα νουκλεοτίδια επιλέχθηκαν οι ίνες αλουμίνας και σταννίας, διότι: 1. σε δοκιμαστικά πειράματα με όλες τις ίνες που παρασκευάστηκαν, οι δύο αυτές παρουσίασαν την υψηλότερη απόδοση προσυγκέντρωσης και 2. στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με την παρασκευή κοίλων ινών αλουμίνας και σταννίας, πολύ δε περισσότερο με τη χρήση τους στην προσυγκέντρωση νουκλεοτιδίων γάλατος. Συνεπώς, η χρήση των ινών αυτών θεωρήθηκε ικανοποιητική επιλογή για την παρούσα μελέτη.

Επίσης, τα νουκλεοτίδια είναι μη πτητικά, πολικά μόρια και ιοντίζονται ανάλογα με το pH που βρίσκονται. Συνεπώς, η χρήση της HILIC θεωρήθηκε κατάλληλη για το διαχωρισμό των νουκλεοτιδίων και την εξαγωγή χρωματογραφικών συμπερασμάτων σχετικά με τις βέλτιστες συνθήκες. Αρχικά, μελετήθηκε η διερεύνηση της επίδρασης των χρωματογραφικών συνθηκών στο διαχωρισμό των νουκλεοτιδίων και τη χρωματογραφική τους συμπεριφορά. Μετά την μελέτη και τη βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών πραγματοποιήθηκε μελέτη της προσυγκέντρωσης των νουκλεοτιδίων σε κεραμικές ίνες αλουμίνας και σταννίας. Εν συνεχεία, οι ίνες χρησιμοποιήθηκαν για την εκλεκτική εκχύλιση των νουκλεοτιδίων από μητρικά και εμπορικά γάλατα και τον προσδιορισμό τους με HILIC-DAD.

3.2.1. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗ HILIC - ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ

Στο παρόν υποκεφάλαιο μελετάται η χρωματογραφική συμπεριφορά μονοφωσφορικών νουκλεοτιδίων στη HILIC και ο προσδιορισμός τους στο μητρικό γάλα και στο βρεφικό γάλα εμπορίου μετά από προσυγκέντρωση. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα επιτρεπόμενα νουκλεοτίδια που μπορούν να προστεθούν στα εμπορικά σκευάσματα είναι τα εξής: Μονοφωσφορική αδενοσίνη, μονοφωσφορική γουανοσίνη, μονοφωσφορική κυτιδίνη, μονοφωσφορική ουρακίλη και μονοφωσφορική ινοσίνη. Συνεπώς, μελετούνται αυτά τα νουκλεοτίδια για τη χρωματογραφική τους συμπεριφορά σε συνθήκες HILIC. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται οι στατικές φάσεις διόλη-πυριτίας, αμινο-πυριτίας και αμιδο-πυριτίας, οι οποίες αποτελούν δημοφιλείς χρωματογραφικά υλικά στη HILIC. Οι χρωματογραφικές παράμετροι που εξετάζονται είναι οι ακόλουθες:

- Ισχύς του διαλύτη έκλουσης μεταβάλλοντας το ποσοστό του ACN στις τρεις στατικές φάσεις (δηλ. διολο-πυριτία, αμινο-πυριτία, αμιδο-πυριτία)
- pH της κινητής φάσης σε pH 3,0, 4,0 και 5,0 με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου/μυρμηκικού οξέος (10 mM)
- Συγκέντρωση του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου/μυρμηκικού οξέος (10, 20 mM) στο βέλτιστο pH 3,0 της κινητής φάσης
- Φύση και η συγκέντρωση του οξέος στην κινητή φάση
- Παρουσία της τριαιθυλαμίνης (TEA) στην κινητή φάση
- Φύση του οργανικού διαλύτη (MeOH, ACN)
- Θερμοκρασία της χρωματογραφικής στήλης σε εύρος τιμών 20-40 °C
- Ροή της κινητής φάσης

3.2.1.1. Επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης στη στατική φάση

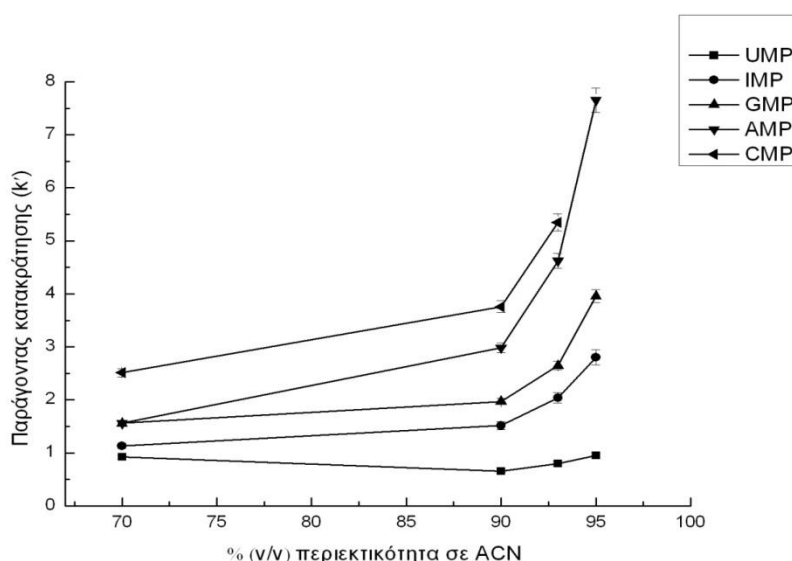
Η χρωματογραφική συμπεριφορά των νουκλεοτιδίων σε σχέση με την ισχύ του διαλύτη έκλουσης μελετήθηκε μεταβάλλοντας το ποσοστό του ACN στην κινητή φάση σε στήλες διοξο-πυριτίας, αμινο-πυριτίας και αμιδο-πυριτίας. Ακολούθως, μελετήθηκε η χρωματογραφική συμπεριφορά των νουκλεοτιδίων στις τρεις αυτές στατικές φάσεις και έγινε η επιλογή της καταλληλότερης. Η έκλουση των νουκλεοτιδίων πραγματοποιήθηκε ισοκρατικά, για να αποφευχθούν οι μεγάλοι χρόνοι εξισορρόπησης που απαιτούνται κατά τη βαθμιδωτή έκλουση.

3.2.1.1.1. Επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης σε στήλη διοξο-πυριτίας

Η χρωματογραφική συμπεριφορά των νουκλεοτιδίων σε σχέση με την ισχύ του διαλύτη έκλουσης μελετήθηκε, μεταβάλλοντας το ποσοστό του ACN στην κινητή φάση από 70 έως 95% (v/v) ισοκρατικά, με ταχύτητα ροής 0,6 mL/min. Σε ποσοστό ACN στην κινητή φάση μικρότερο από 70% (v/v) δεν παρατηρείται καθόλου κατακράτηση, ενώ σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95% (v/v) εμφανίζεται πολύ μεγάλη κατακράτηση των αναλυτών. Η κινητή φάση περιείχε διάλυμα μυρμηκικού οξέος συγκέντρωσης 10 mM και pH 3,0 τόσο στην υδατική όσο και στην οργανική φάση. Στο Σχήμα 3.2.1.1 απεικονίζεται γραφικά η επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης στις τιμές του παράγοντα κατακράτησης (k') των νουκλεοτιδίων. Στον ίδιο Πίνακα παρατίθενται οι αντίστοιχες τιμές του παράγοντα συμμετρίας T_f κάθε κορυφής. Η ασυμμετρία μιας κορυφής και πιο συγκεκριμένα η εμφάνιση "ουράς" (tailing) ή μετώπου (fronting) αποτελεί μια σημαντική παράμετρο καθότι επηρεάζει αρνητικά τόσο την επαναληψιμότητα του χρόνου έκλουσης μιας κορυφής όσο και το διαχωρισμό ενός ζεύγους χρωματογραφικών κορυφών [302].

Στη στήλη διόξο-πυριτίας παρατηρείται ότι τα νουκλεοτίδια δεν εμφανίζουν μεγάλη κατακράτηση. Συγκεκριμένα, σε αναλογία διαλυτών ACN/H₂O 70/30 (v/v) ο παράγοντας κατακράτησης κυμαίνεται από 0,7 έως 2,5. Αυξάνοντας το ποσοστό του ACN γίνεται εμφανής η αύξηση της κατακράτησης των ενώσεων και σε αναλογία διαλυτών ACN/H₂O 95/5 (v/v) εμφανίζεται η μέγιστη κατακράτηση των ενώσεων από τη χρωματογραφική στήλη ($0,9 < k' < 7,6$). Από το Σχήμα 3.2.1.1 παρατηρείται ότι σημαντική διαφοροποίηση στην κατακράτηση των ενώσεων λαμβάνει χώρα σε εύρος περιεκτικότητας ACN 90-95%. Συγκεκριμένα, η τιμή του παράγοντα κατακράτησης για τα UMP, IMP, GMP και CMP αυξάνεται κατά 0,03, 1,67, 2,4 και 2,83 μονάδες αντίστοιχα από την αρχική τιμή του παράγοντα κατακράτησης, ενώ η

αύξηση της κατακράτησης είναι η μεγαλύτερη για το AMP με την τιμή του παράγοντα κατακράτησης να αυξάνεται από 1,5 σε 7,6.



Σχήμα 3.2.1.1. Επίδραση του ποσοστού του ACN της κινητής φάσης στην κατακράτηση των νουκλεοτιδίων σε στήλη διοξο-πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες:

Διαλύτης Α: [υδατικό διάλυμα HCOOH 10 mM, pH 3,0]

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

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C, ταχύτητα ροής κινητής φάσης: 0,6 mL/min

Ανιχνευτής: DAD

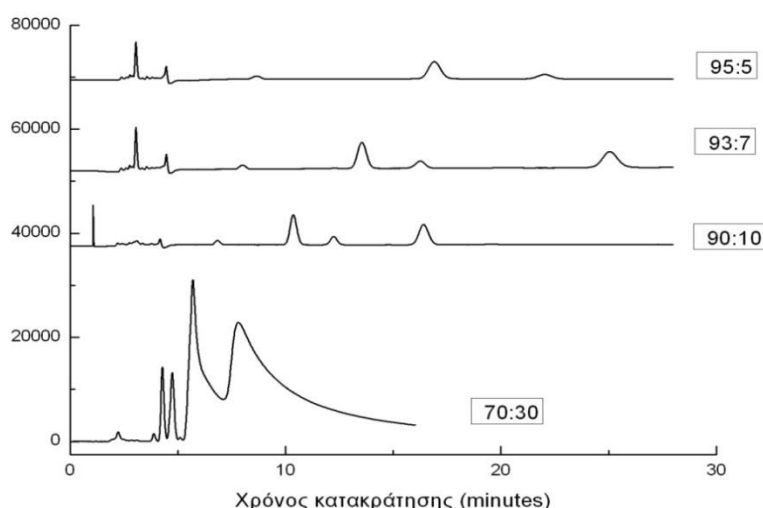
Το ποσοστό του οργανικού διαλύτη (δηλ. ACN) αποτελεί, ίσως, την παράμετρο με τη μεγαλύτερη επίδραση στο χρόνο κατακράτησης [303]. Σε χαμηλά ποσοστά οργανικού διαλύτη, η διαφορά πολικότητας μεταξύ του διαλύτη έκλουσης και της στιβάδας ύδατος στην επιφάνεια της στήλης ελαττώνεται σημαντικά με αποτέλεσμα μια πολική ένωση να εμφανίζει μικρό χρόνο κατακράτησης. Με την αύξηση του ποσοστού του οργανικού διαλύτη η μεγάλη διαφορά στην πολικότητα μεταξύ της ενυδατωμένης επιφάνειας της στήλης και του διαλύτη έκλουσης επιτρέπει την κατανομή της ένωσης στην υδατική στοιβάδα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και επομένως την αύξηση του χρόνου κατακράτησης [304].

Οι τιμές του παράγοντα συμμετρίας (T_f) για διαφορετικές περιεκτικότητες της κινητής φάσης σε οργανικό διαλύτη, δίνονται στον Πίνακα 3.2.1.1. Ο παράγοντας συμμετρίας για τις κορυφές του UMP και IMP κυμαίνεται από 0,9 έως 1,1. Για τις

ενώσεις GMP και AMP, σε ποσοστό οργανικού διαλύτη 70%, παρατηρείται συνέκλωση των δύο αυτών ενώσεων, ενώ αυξάνοντας το ποσοστό του ACN (>90%) οι ενώσεις διαχωρίζονται και ο παράγοντας συμμετρίας κυμαίνεται από 0,9 έως 1,15, εμφανίζοντας ικανοποιητική συμμετρία. Η ένωση CMP, σε ποσοστό ACN 70%, εμφανίζει μεγάλη τιμή παράγοντα συμμετρίας ($T_f = 3,6$), όμως με αύξηση του οργανικού διαλύτη σε ποσοστό ACN 93%, ο παράγοντας συμμετρίας μειώνεται μέχρι την τιμή 1. Στο Σχήμα 3.2.1.2 απεικονίζονται συγκριτικά χρωματογραφήματα των νουκλεοτιδίων σε αναλογίες ACN/H₂O 70/30, 90/10, 93/7 και 95/5 (v/v) και σε συνθήκες ισοκρατικής έκλυσης, ενώ οι αντίστοιχες τιμές της διαχωριστικής ικανότητας R_s της στήλης στο μίγμα των ενώσεων παρατίθενται στον Πίνακα 3.2.1.2.

Πίνακας 3.2.1.1. Επίδραση της εκλουστικής ισχύος στην συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών.

Αναλύτης	Παράγοντας T_f			
	ACN/H ₂ O 70/30	ACN/H ₂ O 90/10	ACN/H ₂ O 93/7	ACN/H ₂ O 95/5
UMP	1,14	1,13	1,02	0,99
IMP	0,99	1,06	1,06	1,04
GMP	Συνέκλωση	1,04	0,99	0,99
AMP	Συνέκλωση	1,05	1,12	1,16
CMP	3,69	0,88	1,06	-



Σχήμα 3.2.1.2. Επίδραση του ποσοστού του ACN στον ισοκρατικό διαχωρισμό των νουκλεοτιδίων σε στήλη διολο-πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.2.1.1. Σειρά έκλουσης νουκλεοτιδίων: UMP-IMP- GMP-AMP-CMP

Σε ποσοστό ACN 70% (v/v) τα GMP και AMP εμφανίζουν σχεδόν τον ίδιο χρόνο κατακράτησης με αποτέλεσμα ο διαχωρισμός τους να είναι ανέφικτος. Αυξάνοντας το ποσοστό του ACN σε 90%, παρατηρείται αύξηση του χρόνου κατακράτησης των ενώσεων, οι οποίες διαχωρίζονται, με τις τιμές διαχωριστικής ικανότητας (R_s) να κυμαίνονται από 3 έως 6,7. Για ποσοστό ACN 95% (v/v), οι ενώσεις διαχωρίζονται πλήρως, όμως η κορυφή που αντιστοιχεί στο AMP, λόγω μεγάλης κατακράτησης, έχει διευρυνθεί με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η επεξεργασία της.

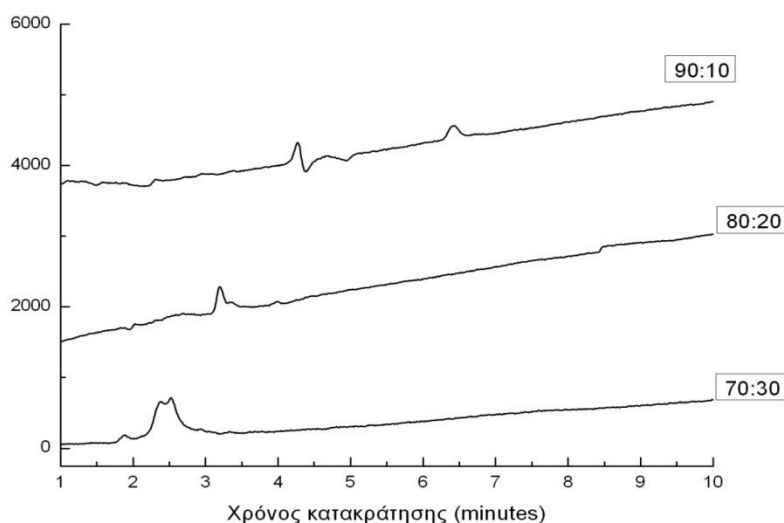
Πίνακας 3.2.1.2. Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης διολο-πυριτίας στο μίγμα νουκλεοτιδίων σε σχέση με το ποσοστό του ACN (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.2.1.1).

	Διαχωριστική ικανότητα, R_s			
	ACN/H ₂ O	ACN/H ₂ O	ACN/H ₂ O	ACN/H ₂ O
Ζεύγος αναλυτών	70/30	90/10	93/7	95/5
UMP /IMP	5,49	6,75	8,11	9,19
IMP/GMP	1,54	3,09	3,27	4,38
GMP /AMP	Συνέκλουση	5,62	7,97	-
AMP /CMP	1,25	3,36	2,77	-

3.2.1.1.2. Επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης σε στήλη αμινο-πυριτίας

Η χρωματογραφική συμπεριφορά των νουκλεοτιδίων σε στήλη αμινο-πυριτίας ως συνάρτηση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης, μελετήθηκε μεταβάλλοντας το ποσοστό του ACN από 70 έως 90% (v/v), σε ταχύτητα ροής 0,6 mL/min. Η κινητή φάση περιείχε διάλυμα μυρμηκικού οξέος συγκέντρωσης 10 mM, pH 3,0 τόσο στην υδατική όσο και στην οργανική φάση.

Στο Σχήμα 3.2.1.3. απεικονίζονται συγκριτικά χρωματογραφήματα των ενώσεων σε αναλογίες ACN/H₂O 70/30, 80/20 και 90/10 (v/v) και σε συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης. Στη στήλη αμινο-πυριτίας, η έκλουση των νουκλεοτιδίων γίνεται σε μικρούς χρόνους κατακράτησης. Συγκεκριμένα, σε αναλογία διαλυτών ACN/H₂O 70/30 (v/v) οι κορυφές εμφανίζουν μικρή κατακράτηση από τη στήλη και δεν υφίσταται διαχωρισμός τους. Με αύξηση του ποσοστού του ACN σε 80% παρατηρείται αύξηση της κατακράτησης, ωστόσο, διαχωρισμός μεταξύ των νουκλεοτιδίων δεν επιτυγχάνεται. Με μεγαλύτερη αύξηση στο ποσοστό του ACN σε 90% παρατηρείται αύξηση του χρόνου κατακράτησης των ενώσεων, όμως ο διαχωρισμός εξακολουθεί να είναι ανέφικτος. Επίσης, αυξάνοντας το ποσοστό του ACN από 70 σε 90% παρατηρείται διεύρυνση των κορυφών των ενώσεων με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η επεξεργασία τους.

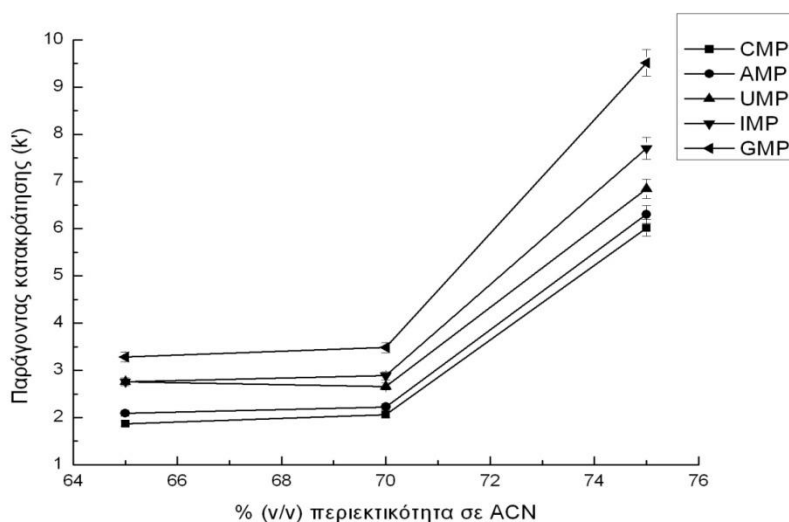


Σχήμα 3.2.1.3. Επίδραση του ποσοστού του ACN στον ισοκρατικό διαχωρισμό των νουκλεοτιδίων σε στήλη αμινο-πυριτίας (pH 3,0). Χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.2.1.1.

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

Η χρωματογραφική συμπεριφορά των νουκλεοτιδίων σε σχέση με την ισχύ του διαλύτη έκλουσης μελετήθηκε μεταβάλλοντας το ποσοστό του ACN στην κινητή φάση από 65 έως 75% (v/v), με ταχύτητα ροής 0,6 mL/min. Η κινητή φάση περιείχε διάλυμα μυρμηκικού οξέος συγκέντρωσης 10 mM και pH 3,0, τόσο στην υδατική όσο και στην οργανική φάση.

Στο Σχήμα 3.2.1.4. απεικονίζεται γραφικά η επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης στις τιμές του παράγοντα κατακράτησης (k') των νουκλεοτιδίων, ενώ στον Πίνακα 3.2.1.3. παρατίθενται οι αντίστοιχες τιμές του παράγοντα συμμετρίας (T_f) της κάθε κορυφής. Στη στήλη αμιδο-πυριτίας παρατηρείται ότι σε αναλογία διαλυτών από 65/35 (v/v) έως 70/30 (v/v), οι ενώσεις εμφανίζουν μικρή κατακράτηση ($1,8 < k' < 3,2$) από τη στήλη. Για ποσοστό ACN/H₂O μεγαλύτερο από 70% γίνεται εμφανής η αύξηση της κατακράτησης των ενώσεων ($6 < k' < 9,5$). Από το Σχήμα 3.1.1.3. παρατηρείται ότι σημαντική διαφοροποίηση στην κατακράτηση των ενώσεων λαμβάνει χώρα σε εύρος περιεκτικότητας ACN 70-75%. Συγκεκριμένα, η τιμή του παράγοντα κατακράτησης για τα νουκλεοτίδια CMP, AMP και UMP αυξάνεται περίπου κατά τέσσερις με πέντε μονάδες. Η αύξηση κατακράτησης είναι ακόμη μεγαλύτερη στα IMP και GMP κατά πέντε και έξι φορές αντίστοιχα.



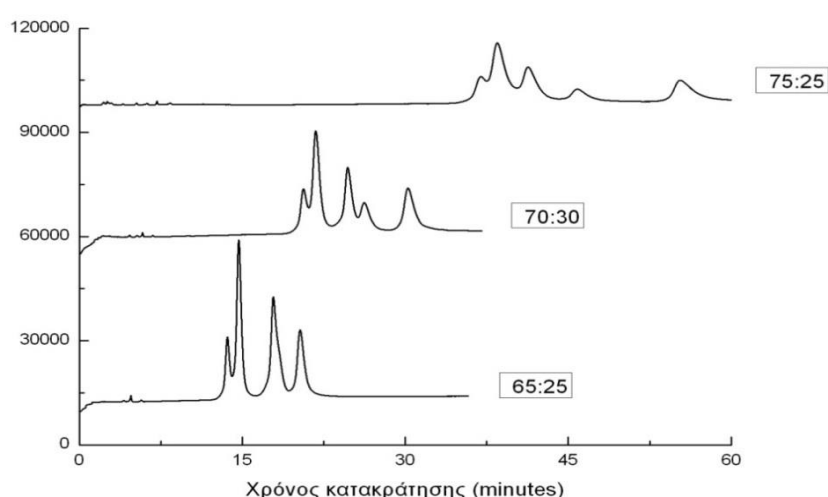
Σχήμα 3.2.1.4. Επίδραση του ποσοστού του ACN της κινητής φάσης στην κατακράτηση των νουκλεοτιδίων σε στήλη αμιδο-πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.2.1.1.

Ο παράγοντας T_f για τις κορυφές των CMP, AMP και UMP βελτιώνεται και κυμαίνεται από 0,8 έως 1 για ποσοστό ACN 65-75%. Στα ποσοστά αυτά ACN, η κορυφή του IMP κυμαίνεται από 1,1 έως 1,2 έχοντας ικανοποιητική συμμετρία. Αντίθετα, η συμμετρία της κορυφής του GMP μειώνεται με αύξηση του ποσοστού του ACN με την εμφάνιση ‘ουράς’ ($1,2 < T_f < 1,4$).

Πίνακας 3.2.1.3. Επίδραση της εκλουστικής ισχύος στην συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών.

Αναλύτης	Παράγοντας T_f		
	ACN/H ₂ O	ACN/H ₂ O	ACN/H ₂ O
	65/35	70/30	75/25
CMP	0,87	0,84	0,91
AMP	Συνέκλωση	0,86	1,01
UMP	Συνέκλωση	0,91	1,09
IMP	1,16	1,14	1,27
GMP	1,22	1,15	1,40

Στο Σχήμα 3.2.1.5 απεικονίζονται συγκριτικά χρωματογραφήματα των νουκλεοτιδίων σε αναλογίες ACN/H₂O 65/35, 70/30 και 75/25 (ν/ν) και σε συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης, ενώ οι αντίστοιχες τιμές της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα των ενώσεων παρατίθενται στον Πίνακα 3.2.1.4.



Σχήμα 3.2.1.5. Επίδραση του ποσοστού του ACN στον ισοκρατικό διαχωρισμό των νουκλεοτιδίων σε στήλη αμιδο-πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες όπως στο Σχήμα 3.2.1.1. Σειρά έκλουσης νουκλεοτιδίων: CMP-AMP- UMP-IMP-GMP

Σε ποσοστό ACN 65%, τα UMP και IMP εμφανίζουν τον ίδιο χρόνο κατακράτησης με αποτέλεσμα ο διαχωρισμός τους να είναι ανέφικτος. Αυξάνοντας το ACN σε ποσοστό 70% παρατηρείται αύξηση του χρόνου κατακράτησης των ενώσεων, και αύξηση του παράγοντα διαχωριστικότητας σε $R_s \sim 0.93$. Σε αντίθεση με το ζεύγος UMP/IMP, δεν πετυχαίνεται πλήρης διαχωρισμός για το ζεύγος των ενώσεων CMP/AMP, με αύξηση του ποσοστού του ACN και με τον παράγοντα διαχωριστικότητας (R_s) να εξακολουθεί να κυμαίνεται κάτω από την τιμή 1. Τα υπόλοιπα ζεύγη ενώσεων έχουν διαχωριστεί πλήρως σε ποσοστό ACN 75%, με την τιμή του R_s να κυμαίνεται από 1,08 έως 2,58.

Πίνακας 3.2.1.4. Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα νουκλεοτιδίων συναρτήσει του ποσοστού του ACN (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.2.1.1).

	Διαχωριστική ικανότητα, R_s		
	ACN/H ₂ O	ACN/H ₂ O	ACN/H ₂ O
Ζεύγος αναλυτών	65/35	70/30	75/25
CMP /AMP	0,85	0.88	0.95
AMP/UMP	2.55	2.26	1.08
UMP /IMP	Συνέκλουση	0.93	1.44
IMP /GMP	1.68	2.13	2.58

Συγκρίνοντας την επίδραση της ισχύος του διαλύτη έκλουσης στις στατικές φάσης διολο-πυριτίας, αμινο-πυριτίας και αμιδο-πυριτίας παρατηρείται ότι στις στήλες διολο-πυριτίας και αμιδο-πυριτίας το φαινόμενο της ηλεκτροστατικής απώσης είναι πιο αισθητό σε σύγκριση με τη στήλη της αμινο-πυριτίας. Με αύξηση του ποσοστού του ACN στην κινητή φάση, οι ηλεκτροστατικές απώσεις που δέχονται οι αρνητικά φορτισμένες ενώσεις εξασθενούν και υπερισχύει η υδρόφιλη κατανομή των ενώσεων και οι δεσμοί υδρογόνου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μεγαλύτερη κατακράτηση των ενώσεων από τις στήλες, που όμως για την αμινο-πυριτία δεν είναι αρκετό για τον διαχωρισμό των ενώσεων. Η στήλη της αμιδο-πυριτίας εμφανίζει καλή εκλεκτικότητα παρόμοια με τη στήλη της διολο-πυριτίας, όμως λόγω της μεγάλης κατακράτησης οι κορυφές διευρύνονται και δεν είναι εφικτή η μελέτη τους. Έτσι, διαπιστώνεται ότι η στήλη αμιδο-πυριτίας δημιουργεί καλύτερες προϋποθέσεις

για το διαχωρισμό των νουκλεοτιδίων και είναι αυτή η οποία επιλέγεται για την βελτιστοποίηση των υπολοίπων παραμέτρων.

3.2.1.2. Επίδραση του pH στην κινητή φάση

Το pH της κινητής φάσης αποτελεί μια κρίσιμη παράμετρο στη HILIC, αλλά και σε άλλες χρωματογραφικές τεχνικές, καθώς καθορίζει αφενός το βαθμό ιοντισμού μιας ένωσης και αφετέρου την εμφάνιση φορτίου στη στατική φάση. Είναι σαφές ότι η πολικότητα μιας ένωσης διαφοροποιείται σημαντικά καθώς μεταβαίνει από την ουδέτερη στην ιοντισμένη μορφή. Κατά συνέπεια, στην HILIC, η ύπαρξη φορτίου αυξάνει σημαντικά το βαθμό κατανομής μιας ένωσης στη στιβάδα ύδατος που βρίσκεται στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Επιπλέον, η ύπαρξη και η ισχύς των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ μιας ένωσης και της στατικής φάσης επηρεάζονται άμεσα ή ελέγχονται από το pH [74, 303, 305].

Από πρακτικής πλευράς, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το pH της υδατικής κινητής φάσης μεταβάλλεται κατά την ανάμιξη με οργανικό διαλύτη, όπως το ACN. Συνήθως, το pH των όξινων ρυθμιστικών διαλυμάτων αυξάνεται με την προσθήκη οργανικού διαλύτη (ACN ή MeOH), ενώ το pH των βασικών ρυθμιστικών διαλυμάτων μειώνεται. Οι μεταβολές του pH του υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος παρουσία οργανικού διαλύτη σχετίζονται με αντίστοιχες διαφοροποιήσεις των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στη χρωματογραφική στήλη. Σε όξινα ρυθμιστικά διαλύματα, η αύξηση της περιεκτικότητας σε οργανικό διαλύτη προκαλεί ελάττωση του βαθμού διάστασης του οξέος και επομένως αύξηση του pH του τελικού υδατο-οργανικού μίγματος. Η ελάττωση του βαθμού διάστασης οφείλεται στη μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς του ύδατος παρουσία οργανικού διαλύτη με αποτέλεσμα την αντίστοιχη ελάττωση της σταθεροποίησης των ιόντων που προκύπτουν από τη διάσταση του οξέος [306]. Συγκεκριμένα, η αύξηση του pH της υδατικής κινητής φάσης που προκύπτει κατά την ανάμιξη με ACN σε ποσοστό 10% (v/v) αντιστοιχεί σε 0,2-0,3 μονάδες περίπου. Αντίστοιχες μεταβολές λαμβάνουν χώρα και στις σταθερές διάστασης οργανικών ενώσεων που ιονίζονται. Με την αύξηση του ποσοστού του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση κατά 10% (v/v), η σταθερά διάστασης (pK_a) ενός ασθενούς οξέος αυξάνεται (~0,2-0,3 μονάδες) ενώ η αντίστοιχη μιας ασθενούς βάσης ελαττώνεται (~0,1-0,2 μονάδες) [306, 307]. Δεδομένης της σχεδόν ανάλογης μεταβολής τόσο του pH της κινητής φάσης όσο και των σταθερών διάστασης των ενώσεων, η μελέτη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των νουκλεοτιδίων

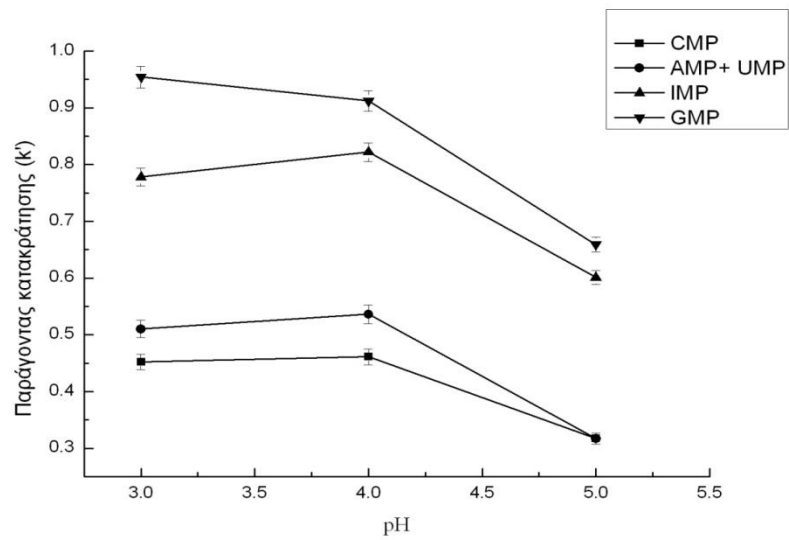
συναρτήσει του pH της κινητής φάσης, στηρίζεται στις σταθερές διάστασης των υδατοδιαλυτών νουκλεοτιδίων στα υδατικά διαλύματα.

Για τη μελέτη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των νουκλεοτιδίων σε σχέση με το pH της κινητής φάσης, χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου/μυρμηκικού οξέος για την περιοχή pH 3,0-5,0. Οι συγκεντρώσεις των αλάτων σε όλες τις περιπτώσεις είναι 10 mM. Στο Σχήμα 3.2.1.6. φαίνεται η επίδραση του pH της κινητής φάσης στην κατακράτηση των νουκλεοτιδίων συναρτήσει του ποσοστού του ACN στην κινητή φάση. Σημαντικό ρόλο στην αύξηση του χρόνου κατακράτησης διαδραματίζει η ισχύς του διαλύτη έκλουσης και αυτό παρατηρείται με την αύξηση των χρόνων κατακράτησης που είναι μεγαλύτεροι σε ποσοστό ACN 75%. Σε αναλογίες ACN, 65/35 και 70/30 (v/v) παρατηρείται μικρή κατακράτηση και συνέκλωση των νουκλεοτιδίων AMP και UMP, ανεξαρτήτου τιμής του pH. Αντιθέτως, σε αναλογία 75/25, όπου υπάρχει μεγαλύτερη κατακράτηση των ενώσεων από τη στήλη ($1,2 < k' < 3,4$), παρατηρείται ότι το ζεύγος AMP/UMP διαχωρίζεται.

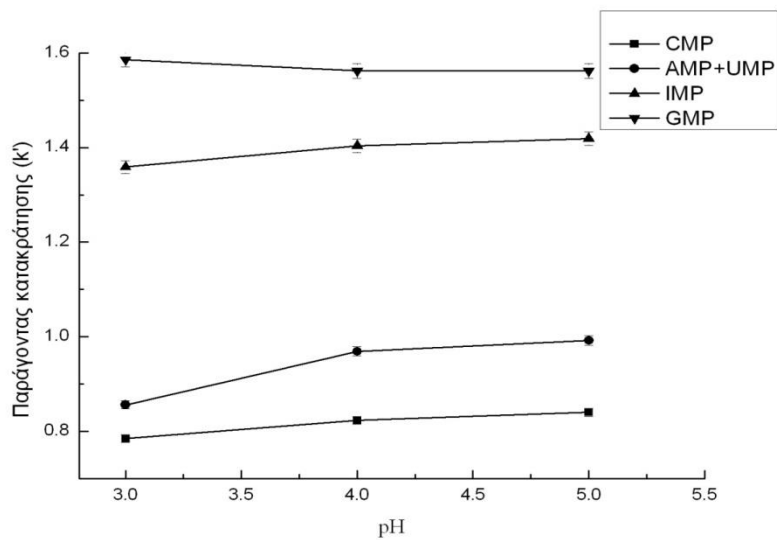
Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι χρόνοι κατακράτησης είναι μεγαλύτεροι σε αναλογία ACN 75%. Το CMP έχει τρεις σταθερές διάστασης, $pK_{a1} \approx 0,8$, $pK_{a2} \approx 4,5$ και $pK_{a3} \approx 6,3$, το AMP έχει τρεις σταθερές διάστασης $pK_{a1} \approx 0,9$, $pK_{a2} \approx 3,8$ και $pK_{a3} \approx 6,1$ οι οποίες αντιστοιχούν α) στο άζωτο του πυριμιδινικού δακτυλίου (pK_{a1}), β) στην φωσφορική ομάδα, η οποία αποπρωτονιώνεται (pK_{a2}), γ) στο υδροξύλιο της πεντόζης που αποπρωτονιώνεται (pK_{a3}) [308]. Το UMP έχει και αυτό τρεις σταθερές διάστασης, $pK_{a1} \approx 1,0$, $pK_{a2} \approx 6,4$ και $pK_{a3} \approx 9,5$, το IMP έχει δύο σταθερές διάστασης, $pK_{a1} \approx 0,51$ και $pK_{a2} \approx 1,3$, ενώ το GMP έχει τέσσερις σταθερές διάστασης, $pK_{a1} \approx 0,7$, $pK_{a2} \approx 2,4$, $pK_{a3} \approx 6,1$ και $pK_{a4} \approx 9,4$. Στο παράρτημα Γ παρουσιάζονται τα διαγράμματα κατανομής των νουκλεοτιδίων.

Σε ποσοστό ACN 75%, ο χρόνος κατακράτησης των νουκλεοτιδίων αυξάνεται σημαντικά με αύξηση του pH της κινητής φάσης από 3,0 σε 4,0. Σύμφωνα με τις σταθερές διάστασης, τα νουκλεοτίδια αποπρωτονιώνονται και φέρουν μερικό αρνητικό φορτίο σε αυτό το εύρος pH. Η πολικότητα που προσδίδει η ύπαρξη φορτίου στα νουκλεοτίδια, στο εύρος pH 3,0 - 4,0, έχει ως αποτέλεσμα να κατανέμονται σε μεγαλύτερο βαθμό στην υδατική στιβάδα, που βρίσκεται στην επιφάνεια της στατικής φάσης και να αυξάνεται σημαντικά η κατακράτησή τους. Με αύξηση του pH από 4,0 σε 5,0 τα νουκλεοτίδια CMP, AMP, IMP και GMP ιοντίζονται περαιτέρω - συγκεκριμένα, το IMP υφίσταται ολική αποπρωτονίωση -

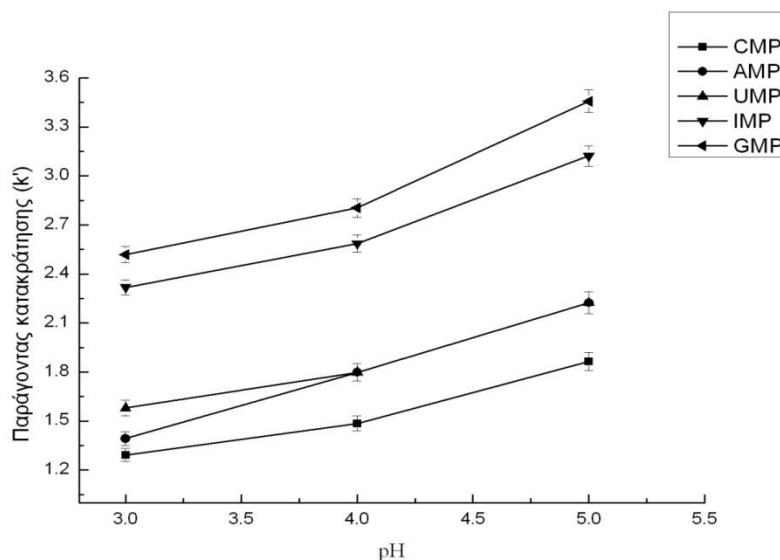
αυξάνεται το αρνητικό φορτίο των ενώσεων και αυξάνεται περισσότερο η κατακράτησή τους.



(α)



(β)



(γ)

Σχήμα 3.2.1.6. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του pH της κινητής φάσης στον παράγοντα κατακράτησης των νουκλεοτιδίων σε διαφορετικές αναλογίες διαλυτών έκλουσης. Τα γραφήματα απεικονίζουν τις εξής αναλογίες κινητής φάσης: (α) 65:35, (β) 70:30, (γ) 75:25.

Χρωματογραφικές συνθήκες:

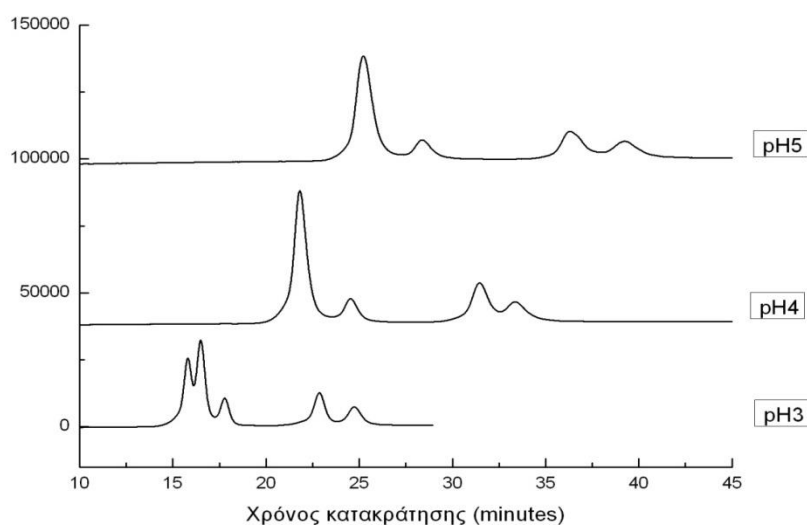
Διαλύτης Α: [υδατικό διάλυμα HCOOH/HCOONH₄ 10 mM]

Διαλύτης Β: [ACN /υδατικό HCOOH/HCOONH₄ 10 mM]

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C, Ανιχνευτής: DAD

Σειρά έκλουσης νουκλεοτιδίων: CMP-AMP- UMP-IMP-GMP

Τυπικά χρωματογραφήματα της επίδρασης του pH της κινητής φάσης στο διαχωρισμό του μίγματος των νουκλεοτιδίων, παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.2.2.7., ενώ οι αντίστοιχες τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης δίνονται στον Πίνακα 3.2.1.5. Σε pH 3,0 παρατηρείται ατελής διαχωρισμός των ενώσεων CMP και AMP ($R_s = 0,68$), ενώ έχουν πλήρως διαχωριστεί οι ενώσεις IMP και GMP ($R_s = 1,46$). Σε pH 4,0 και 5,0, οι ενώσεις CMP και AMP διαχωρίζονται με διαχωριστική ικανότητα $R_s = 2,16$ και $R_s = 2,04$ αντίστοιχα.



Σχήμα 3.2.1.7. Επίδραση του pH στον ισοκρατικό διαχωρισμό των νουκλεοτιδίων σε στήλη αμιδο-πυριτίας. (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.2.1.6).

Πίνακας 3.2.1.5. Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα νουκλεοτιδίων συναρτήσει του pH (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.2.1.6.).

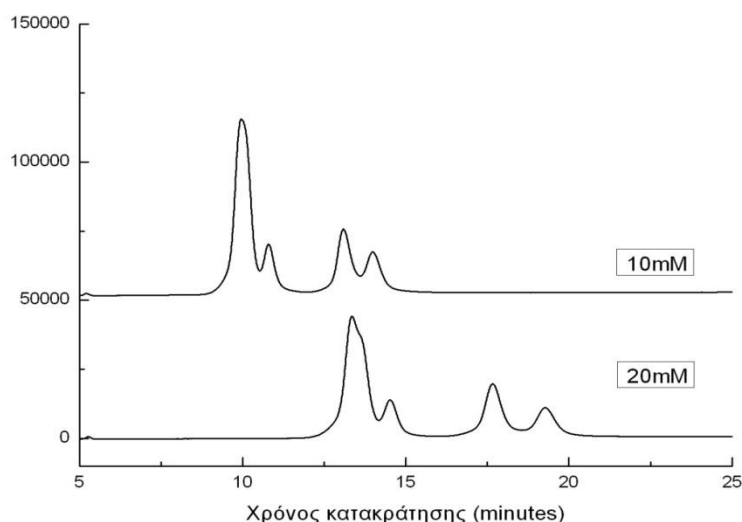
Ζεύγος αναλυτών	Διαχωριστική ικανότητα, R_s		
	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0
CMP / AMP	0,68	2,16	2,04
AMP/ UMP	1,30	5,05	4,62
UMP / IMP	5,45	1,29	1,46
IMP/ GMP	1,68	—	—

Με όσα παρατηρούνται παραπάνω η χρήση κινητής φάσης με pH 3,0 και ποσοστό ACN 75% (v/v) οδηγεί στον επιτυχή διαχωρισμό των νουκλεοτιδίων.

3.2.1.3. Επίδραση της συγκέντρωσης του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος

Η μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου πραγματοποιήθηκε σε pH 3,0, όπου έλαβε χώρα ο βέλτιστος διαχωρισμός του μίγματος των νουκλεοτιδίων. Οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν στην κινητή φάση ήταν 10 και 20 mM. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού

αμμωνίου δεν είναι εφικτή λόγω του περιορισμού της διαλυτότητας του άλατος στην οργανική φάση. Τυπικά χρωματογραφήματα της επίδρασης της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου στο διαχωρισμό του μίγματος των νουκλεοτιδίων απεικονίζονται στο Σχήμα 3.2.1.8. Οι αντίστοιχες τιμές διαχωριστικής ικανότητας R_s παρατίθενται στον Πίνακα 3.2.1.6.



Σχήμα 3.2.1.8. Επίδραση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου στον ισοκρατικό διαχωρισμό των νουκλεοτιδίων σε στήλη αμιδο-πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες:

Ποσοστό ACN: 75% (v/v)

Διαλύτης Α: [υδατικό διάλυμα HCOONH_4]

Διαλύτης Β: [90% ACN / 10% υδατικό HCOONH_4]

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C, Ανιχνευτής: DAD

Σειρά έκλυσης νουκλεοτιδίων: CMP-AMP- UMP-IMP-GMP

Σε συγκέντρωση μυρμηκικού αμμωνίου 10 mM, η ελάττωση του χρόνου κατακράτησης του AMP έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της διαχωριστικής ικανότητας για το ζεύγος ενώσεων CMP/AMP και τη συνέκλωσή τους. Με αύξηση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου από τα 10 στα 20 mM, παρατηρείται αύξηση της κατακράτησης των ενώσεων και αύξηση των τιμών της διαχωριστικής ικανότητας ($1,45 < R_s < 4,23$). Οι ενώσεις όμως, CMP και AMP παρά την αύξηση της κατακράτησής τους συνεκλούνται.

Πίνακας 3.2.1.6. Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα νουκλεοτιδίων συναρτήσει της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου. Χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.2.1.8.).

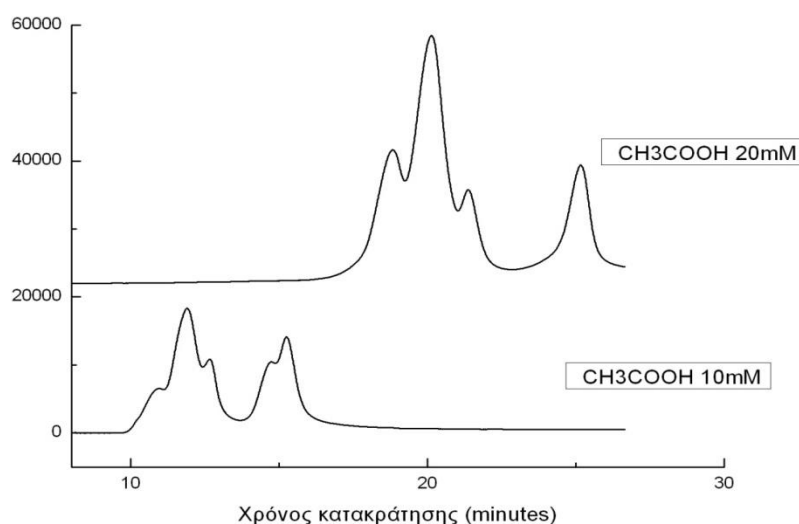
Ζεύγος αναλυτών	Διαχωριστική ικανότητα, R_s	
	HCOONH ₄	HCOONH ₄
	10 mM	20 mM
CMP / AMP	συνέκλωση	συνέκλωση
AMP/ UMP	1,32	1,45
UMP / IMP	3,90	4,23
IMP/ GMP	1,07	1,70

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που αφορούν την επίδραση της συγκέντρωσης του άλατος, σε συγκέντρωση άλατος 20 mM παρατηρείται καλύτερος διαχωρισμός των ενώσεων. Με βάση το μηχανισμό της HILIC, τα ιόντα του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος στην κινητή φάση, σε υψηλά ποσοστά ACN, "προτιμούν" να κατανέμονται (στο μεγαλύτερο ποσοστό τους) στη στιβάδα ύδατος που βρίσκεται στην επιφάνεια της στήλης. Με αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος στην κινητή φάση, όλο και περισσότερα επιδιαλυτωμένα ιόντα κατανέμονται στην υδατική στοιβάδα, με αποτέλεσμα την αύξηση της υδροφιλικότητάς της και επομένως την αύξηση του χρόνου κατακράτησης των ενώσεων μέσω του μηχανισμού κατανομής [303]. Έτσι, παρατηρείται ότι η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου / μυρμηκικού οξέος δεν είναι επιθυμητή και γι αυτό δοκιμάστηκε η χρήση οργανικών οξέων αποκλειστικά, για τη δημιουργία κινητής φάσης με pH 3,0.

3.2.1.4. Επίδραση της φύσης και της συγκέντρωσης του οξέος στην κινητή φάση

Η επίδραση διαφορετικών οξέων και διαφορετικών συγκεντρώσεών τους στη χρωματογραφική συμπεριφορά των νουκλεοτιδίων μελετήθηκε διατηρώντας το pH της κινητής φάσης σταθερό στην τιμή 3,0. Τα οξέα που χρησιμοποιήθηκαν είναι το οξικό και το μυρμηκικό οξύ. επίσης, διερευνήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης των παραπάνω οξέων, σε συγκεντρώσεις 10 και 20 mM για το οξικό οξύ και 5, 10 και 20 mM για το μυρμηκικό οξύ.

Στο Σχήμα 3.2.1.9. απεικονίζονται χρωματογραφήματα της επίδρασης της συγκέντρωσης του οξικού οξέος στο διαχωρισμό του μίγματος των νουκλεοτιδίων, ενώ οι αντίστοιχες τιμές διαχωριστικής ικανότητας παρατίθενται στον Πίνακα 3.2.1.7. Όταν η συγκέντρωση του οξέος είναι 10 mM ο διαχωρισμός που πραγματοποιείται δεν είναι ικανοποιητικός, με τις τιμές της διαχωριστικής ικανότητας να κυμαίνονται κάτω από τη μονάδα ($0,2 < R_s < 0,6$) με εξαίρεση το ζεύγος ενώσεων UMP/IMP που διαχωρίζεται ικανοποιητικά ($R_s=1,1$). Με αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος στα 20 mM παρατηρείται αύξηση της κατακράτησης των νουκλεοτιδίων που όμως δε οδηγεί σε πλήρη διαχωρισμό των ενώσεων, με συνέπεια τη συνένωση του ζεύγους ενώσεων CMP και AMP.



Σχήμα 3.2.1.9. Επίδραση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος στον ισοκρατικό διαχωρισμό των νουκλεοτιδίων, σε στήλη αμιδο-πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες:

Ποσοστό ACN: 75% (v/v)

Διαλύτης Α: [υδατικό διάλυμα CH_3COOH , pH 3.0]

Διαλύτης Β: [90% ACN / 10% υδατικό CH_3COOH]

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C, Ανιχνευτής: DAD

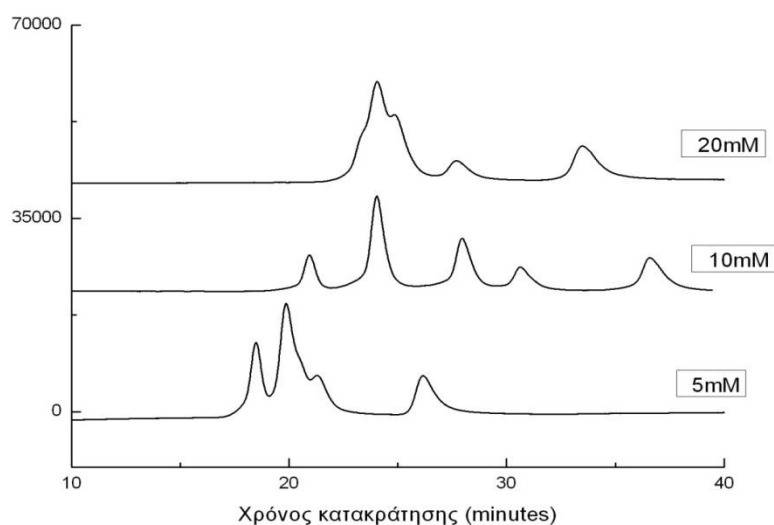
Σειρά έκλουσης νουκλεοτιδίων: CMP-AMP- UMP-IMP-GMP

Πίνακας 3.2.1.7. Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα νουκλεοτιδίων συναρτήσει της συγκέντρωσης του οξικού οξέος. Χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.2.1.9.).

Ζεύγος αναλυτών	Διαχωριστική ικανότητα, R_s	
	CH ₃ COOH	CH ₃ COOH
	10 mM	20 mM
CMP / AMP	0,39	συνέκλουση
AMP/ UMP	0,28	1,29
UMP / IMP	1,11	1,78
IMP/ GMP	0,64	1,55

Σε ότι αφορά την παρουσία του μυρμηκικού οξέος, όταν η συγκέντρωσή του στην κινητή φάση είναι 5 mM, παρατηρείται ελάττωση του χρόνου κατακράτησης του AMP που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της διαχωριστικής ικανότητας για το ζεύγος ενώσεων AMP/UMP και συνεπώς τη συνέκλουσή τους. Με την αύξηση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού οξέος από τα 5 στα 10 mM, παρατηρείται πλήρης διαχωρισμός των πέντε νουκλεοτιδίων. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης από τα 10 στα 20 mM οδηγεί σε μικρή μείωση της κατακράτησης με αποτέλεσμα τα CMP, AMP και UMP να παρουσιάζουν παρόμοιους χρόνους κατακράτησης και να μην είναι εφικτός ο διαχωρισμός τους. Χρωματογράφημα της επίδρασης της συγκέντρωσης του μυρμηκικού οξέος στο διαχωρισμό του μίγματος των νουκλεοτιδίων απεικονίζονται στο Σχήμα 3.2.1.10. ενώ οι αντίστοιχες τιμές διαχωριστική ικανότητας παρατίθενται στον Πίνακα 3.2.1.8.

Παρατηρείται διαφορετική χρωματογραφική συμπεριφορά με την προσθήκη των δύο οξέων. Κατ' αρχάς, να σημειωθεί ότι η παρουσία των οξέων συντελεί στην αύξηση της κατακράτησης των ενώσεων σε σχέση με τα άλατα, όπως το CH₃COONH₄, που χρησιμοποιούνται στη HILIC. Επίσης, το HCOOH παρουσιάζει μεγαλύτερη μείωση της ηλεκτροστατικής άπωσης που δέχονται οι ενώσεις από τη στήλη - πιθανότατα λόγω του μικρότερου μεγέθους του μορίου του σε σχέση με το CH₃COOH - με αποτέλεσμα την μεγαλύτερη κατακράτηση των ενώσεων και το τελικό διαχωρισμό τους.



Σχήμα 3.2.1.10. Επίδραση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού οξέος στον ισοκρατικό διαχωρισμό των νουκλεοτιδίων σε στήλη αμιδο-πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες:

Ποσοστό ACN: 75% (v/v)

Διαλύτης Α: [υδατικό διάλυμα HCOOH, pH 3.0]

Διαλύτης Β: [90% ACN / 10% υδατικό HCOOH]

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C, Ανιχνευτής: DAD

Σειρά έκλουσης νουκλεοτιδίων: CMP-AMP- UMP-IMP-GMP

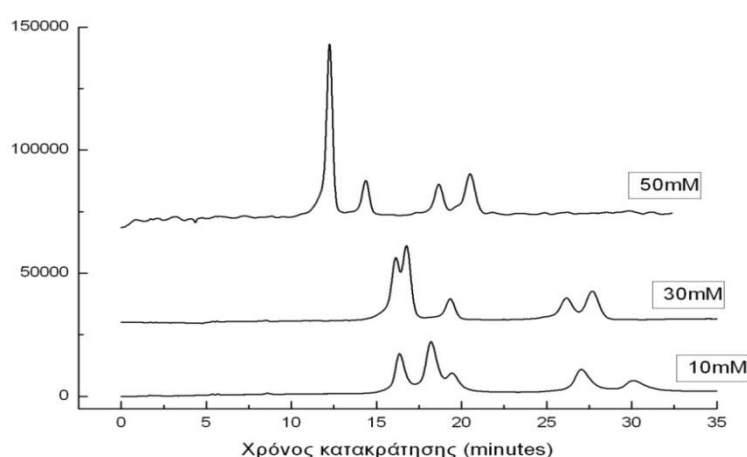
Πίνακας 3.2.1.8. Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα νουκλεοτιδίων συναρτήσει της συγκέντρωσης του οξικού οξέος. Χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.2.1.10.).

Ζεύγος αναλυτών	Διαχωριστική ικανότητα, R_s		
	HCOOH	HCOOH	HCOOH
	5 mM	10 mM	20 mM
CMP / AMP	1,12	2,94	συνέκλωση
AMP/ UMP	συνέκλωση	2,02	συνέκλωση
UMP / IMP	0,66	3,82	12,8
IMP/ GMP	2,07	0,97	0,45

Από την παραπάνω μελέτη προκύπτει ότι για το διαχωρισμό των νουκλεοτιδίων η παρουσία μυρμηκικού οξέος 10 mM για pH 3,0 στην κινητή φάση είναι απαραίτητη για το διαχωρισμό των πέντε νουκλεοτιδίων.

3.2.1.5. Επίδραση της προσθήκης τριαιθυλαμίνης (TEA) στην κινητή φάση (10, 30, 50)

Η ύπαρξη ελεύθερων ομάδων σιλανόλης στο υλικό πλήρωσης μιας χρωματογραφικής στήλης αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες εμφάνισης μη συμμετρικών κορυφών σε ενώσεις που φέρουν χαρακτηριστικές ομάδες που δρουν ως δέκτες πρωτονίων (συνήθως βασικοί αναλύτες). Η TEA χρησιμοποιείται συχνά ως τροποποιητής (modifier) στην HPLC με σκοπό την αδρανοποίηση των ελεύθερων σιλανομάδων του υλικού πλήρωσης και τη βελτίωση του σχήματος των χρωματογραφικών κορυφών [309]. Για τη μελέτη της επίδρασης της TEA στη συμμετρία των κορυφών των νουκλεοτιδίων πραγματοποιήθηκε προσθήκη TEA στην κινητή φάση σε συγκεντρώσεις 10, 30 και 50 mM. Στο Σχήμα 3.2.1.11. απεικονίζεται γραφικά το αποτέλεσμα της προσθήκης TEA σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών των νουκλεοτιδίων. Η προσθήκη TEA στην κινητή φάση έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της συμμετρίας των κορυφών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με σχετικές θεωρητικές μελέτες, με βάση τις οποίες οι αποτελεσματικές συγκεντρώσεις TEA για τη βελτίωση της συμμετρίας των χρωματογραφικών κορυφών κυμαίνονται από 10 έως 50 mM [309].



Σχήμα 3.2.1.11. Επίδραση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού οξέος στον ισοκρατικό διαχωρισμό των νουκλεοτιδίων σε στήλη αμιδο-πυριτίας.

Χρωματογραφικές συνθήκες:

Ποσοστό ACN: 75% (v/v)

Διαλύτης A: [υδατικό διάλυμα TEA]

Διαλύτης B: [90% ACN / 10% υδατικό TEA]

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C, Ανιχνευτής: DAD

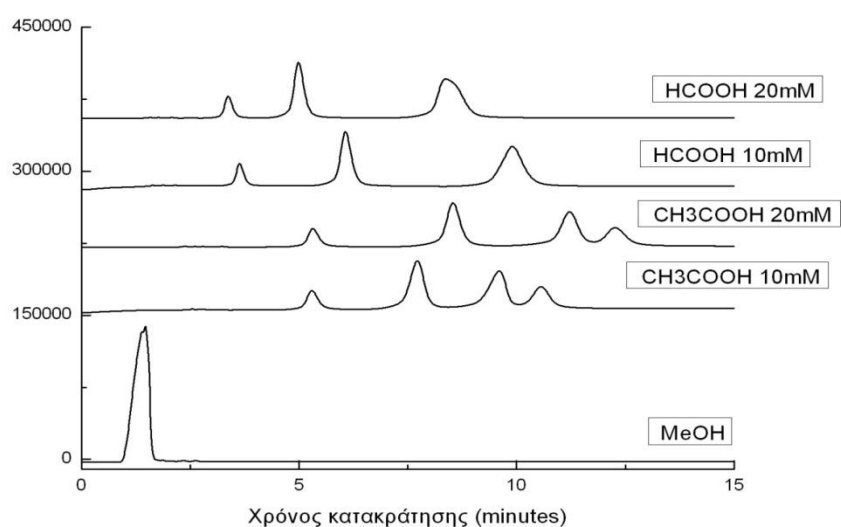
Σειρά έκλυσης νουκλεοτιδίων: CMP-AMP- UMP-IMP-GMP

Παρατηρείται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της TEA στην κινητή φάση συμβάλλει στη βελτίωση του σχήματος των χρωματογραφικών κορυφών, όμως προκαλεί και τη μείωση της διαχωριστικής ικανότητας των ενώσεων με αποτέλεσμα σε συγκέντρωση TEA 50 mM να συνεκλούνται οι ενώσεις CMP και AMP. Έτσι, η χρήση της TEA δεν κρίνεται απαραίτητη.

3.2.1.6. Επίδραση της φύσης του οργανικού διαλύτη

Στη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών οργανικών διαλυτών στην κατακράτηση και το διαχωρισμό του μίγματος των νουκλεοτιδίων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν το ACN και η MeOH καθώς οι δύο αυτοί διαλύτες είναι οι πιο διαδεδομένοι στη HILIC λόγω και της αναμιξιμότητας με το νερό. Ο οργανικός διαλύτης αναμίχθηκε με το υδατικό τμήμα της κινητής φάσης, παρουσία οξέος (μυρμηκικού ή οξικού οξέος) συγκεντρώσεων 10 και 20 mM, σε pH=3,0 (δηλ. βέλτιστο pH). Στα Σχήματα 3.2.1.12. και 3.2.1.13. παρατίθενται συγκριτικά χρωματογραφήματα της επίδρασης των διαφορετικών οργανικών διαλυτών με διαφορετικά οξέα και συγκεντρώσεις αυτών.

Στην περίπτωση χρήσης της MeOH στην κινητή φάση, χωρίς την προσθήκη οξέος, ο διαχωρισμός του μίγματος των ενώσεων είναι ανεπιτυχής, αφού οι ενώσεις δεν κατακρατούνται. Αντίθετα, με την προσθήκη οξέων πραγματοποιείται διαχωρισμός, ο οποίος μάλιστα, εξαρτάται εκτός από τη φύση και τη συγκέντρωση του οξέος που προστίθεται [310]. Με την προσθήκη μυρμηκικού οξέος στην κινητή φάση πραγματοποιείται κατακράτηση των ενώσεων, που όμως δεν είναι ικανή να διαχωρίσει πλήρως τις ενώσεις. Με την αλλαγή του οξέος από μυρμηκικό σε οξικό οξύ αυξάνεται η κατακράτηση των υπό ανάλυση ενώσεων, χωρίς όμως πάλι ο διαχωρισμός να είναι πλήρης. Τέλος, με αύξηση της συγκέντρωσης από 10 σε 20 mM αυξάνεται ο χρόνος κατακράτησης των ενώσεων, όμως ο διαχωρισμός δεν είναι εφικτός.



Σχήμα 3.2.1.12. Επίδραση της MeOH στον ισοκρατικό διαχωρισμό των νουκλεοτιδίων σε στήλη αμιδο-πυριτίας και παρουσία μυρμηκικού ή οξικού οξέος, 0, 10 και 20 mM. Χρωματογραφικές συνθήκες:

Ποσοστό MeOH: 75% (v/v)

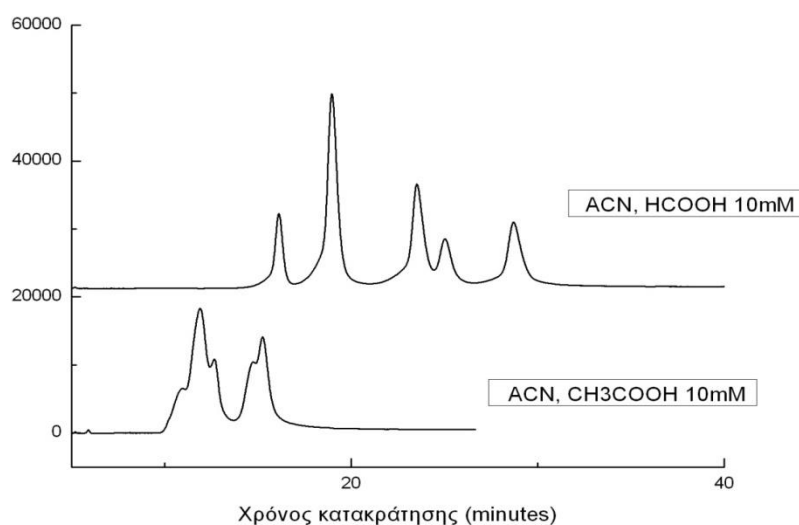
Διαλύτης Α: [υδατικό διάλυμα οξέος]

Διαλύτης Β: [90% ACN / 10% υδατικό οξύ]

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C, Ανιχνευτής: DAD

Σειρά έκλουσης νουκλεοτιδίων: CMP-AMP- UMP-IMP-GMP

Στην περίπτωση του ACN στην κινητή φάση για το διαχωρισμό των ενώσεων, παρατηρείται ότι σε αντίθεση με το οξικό οξύ, το μυρμηκικό αυξάνει το χρόνο κατακράτησης των ενώσεων και διαχωρίζει πλήρως τις ενώσεις (πραγματοποιήθηκε η χρήση των δύο οξέων σε συγκέντρωση μόνο 10 mM, διότι σύμφωνα με το 3.2.4. η συγκέντρωση αυτή είναι η βέλτιστη για τον διαχωρισμό των ενώσεων).



Σχήμα 3.2.1.13. Επίδραση του ACN στον ισοκρατικό διαχωρισμό των νουκλεοτιδίων σε στήλη αμιδο-πυριτίας και παρουσία μυρμηκικού ή οξικού οξέος, 10mM. Χρωματογραφικές συνθήκες:

Ποσοστό ACN: 75% (v/v)

Διαλύτης Α: [υδατικό διάλυμα οξέος]

Διαλύτης Β: [90% ACN / 10% υδατικό οξύ]

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C, Ανιχνευτής: DAD

Σειρά έκλουσης νουκλεοτιδίων: CMP-AMP- UMP-IMP-GMP

Η διαφορά στη συμπεριφορά των δύο αυτών διαλυτών μπορεί να μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική ικανότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου του κάθε οργανικού διαλύτη σε σύγκριση με αυτή του ύδατος [51]. Η MeOH χαρακτηρίζεται από την ιδιότητά της να δρα ως ισχυρός δότης δεσμών υδρογόνου όσο και ως ισχυρός δέκτης δεσμών υδρογόνου. Αντίθετα, το ACN δρα ως ασθενής δέκτης πρωτονίων και ακόμα ασθενέστερα ως δότης πρωτονίων [337]. Λόγω της ισχυρής ικανότητας δημιουργίας δεσμών υδρογόνου, η MeOH δρα ανταγωνιστικά ως προς το μηχανισμό κατανομής στην υδατική στιβάδα [338]. Κατά συνέπεια, μόρια τα οποία φέρουν χαρακτηριστικές ομάδες με δυνατότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου, όπως οι προς μελέτη ενώσεις, εμφανίζουν πολύ μικρούς χρόνους κατακράτησης. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η MeOH διαταράσσει το σχηματισμό της στιβάδας ύδατος στην επιφάνεια της στήλης, αντικαθιστώντας μόρια ύδατος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία

μιας περισσότερο υδρόφοβης στατικής φάσης [51]. Συμπερασματικά, χρησιμοποιείται κινητή φάση ACN με προσθήκη μυρμηκικού οξέος 10 mM.

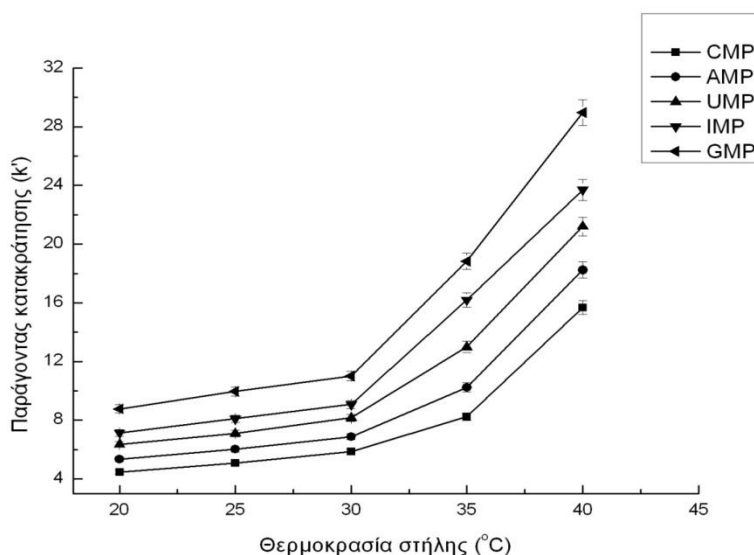
3.2.1.7. Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης

Η αύξηση της θερμοκρασίας της χρωματογραφικής στήλης μειώνει το χρόνο ανάλυσης στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Το πόσο επηρεάζει η θερμοκρασία της στήλης εξαρτάται από παράγοντες όπως, τα χαρακτηριστικά της αναλυόμενης ουσίας, και της στατικής φάσης καθώς και η σύσταση της κινητής φάσης [311]. Είναι γνωστό ότι στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση της υδροφοβικότητας της κινητής φάσης [312] μειώνοντας την κατακράτηση των υδρόφιλων αναλυτών. Στη HILIC θα αναμενόταν να γίνεται το αντίθετο, δηλαδή, η κατακράτηση των υδρόφιλων ομάδων θα πρέπει να αυξάνεται με την άνοδο της θερμοκρασίας, διότι η ισχύς της κινητής φάσης μειώνεται. Παρόλα αυτά, στη βιβλιογραφία έχει διαπιστωθεί τόσο αύξηση όσο και μείωση της κατακράτησης με την αύξηση της θερμοκρασίας. Έτσι, τα ευρήματα αυτά αποδεικνύουν ότι η φύση του αναλύτη και της στατικής φάσης και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις επηρεάζουν τη κατακράτηση στη HILIC [303, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318]. Επιπλέον, αυξάνοντας τη θερμοκρασία της στήλης παρατηρείται διεύρυνση των κορυφών με αποτέλεσμα τη μείωση της διαχωριστικής ικανότητας μεταξύ των κορυφών [311, 319]. Επίσης, σύμφωνα με έρευνα του Karanawa και των συνεργατών του η συμπεριφορά των αναλυτών στην αύξηση της θερμοκρασίας εξαρτάται και από το pH της κινητής φάσης [320].

Η επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης στο χρόνο κατακράτησης των νουκλεοτιδίων μελετήθηκε μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία από 20 έως 40°C. Η σύσταση της κινητής φάσης, που αποτελούταν από ACN/H₂O 75/25 (v/v) σε pH 3,0, διατηρήθηκε σταθερή στο εξεταζόμενο εύρος θερμοκρασίας. Η αύξηση της θερμοκρασίας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου κατακράτησης όλων των υπό μελέτη ενώσεων. Ο παράγοντας κατακράτησης (k') σε θερμοκρασία 20 °C κυμαίνεται από 4,4 έως 8,7, ενώ αυξάνοντας τη θερμοκρασία στους 40°C ο παράγοντας κατακράτησης (k') αυξάνεται με τις τιμές να κυμαίνονται από 15,6 έως 28,9 (Σχήμα 3.2.1.14). Σε θερμοκρασία στήλης 20°C, οι ενώσεις διαχωρίζονται πλήρως με τη διαχωριστική ικανότητα R_s να κυμαίνεται από 2,2 έως 3,9. Αυξάνοντας τη θερμοκρασία παρατηρείται αύξηση της κατακράτησης των ενώσεων με αποτέλεσμα την διεύρυνση των κορυφών και τη μείωση της διαχωριστικής

ικανότητας ($2,1 < R_s < 3,7$) χωρίς αυτό ουσιαστικά να επηρεάζει το διαχωρισμό. Στον Πίνακα 3.2.1.9. δίνεται η διαχωριστική ικανότητα σε διαφορετικές θερμοκρασίες για ζεύγη των υπό μελέτη ενώσεων.

Με την αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης, θα ήταν αναμενόμενο οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των νουκλεοτιδίων και της επιφάνειας της ενυδατωμένης στιβάδας, να εξασθενούν με αποτέλεσμα να μειώνεται η κατακράτησή τους από τη στήλη [321]. Όμως, σε pH=3,0, τα νουκλεοτίδια είναι διπρωτονιωμένα, με το IMP να είναι πλήρως αποπρωτονιωμένο, έχοντας ως αποτέλεσμα, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αποπρωτονιωμένων φωσφονικών ομάδων και της στατικής φάσης να προκαλούν αύξηση της κατακράτησης με την άνοδο της θερμοκρασίας.



Σχήμα 3.2.1.14. Επίδραση θερμοκρασίας στον ισοκρατικό διαχωρισμό των νουκλεοτιδίων σε στήλη αμιδο-πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες:

Ποσοστό ACN: 75% (v/v),

Διαλύτης Α: [υδατικό διάλυμα HCOOH 10 mM, pH 3.0]

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

Ανιχνευτής: DAD

Σειρά έκλουσης νουκλεοτιδίων: CMP-AMP- UMP-IMP-GMP

Πίνακας 3.2.1.9. Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα νουκλεοτιδίων συναρτήσει της θερμοκρασίας. Χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.2.1.14.).

Ζεύγος αναλυτών	Διαχωριστική ικανότητα, R_s				
	T = 20°C	T = 25°C	T = 30°C	T = 35°C	T = 40°C
CMP / AMP	3,16	3,04	2,98	2,96	2,94
AMP/ UMP	3,20	3,19	3,05	2,99	2,95
UMP / IMP	2,21	2,19	2,18	1,98	2,16
IMP/ GMP	3,95	3,82	3,79	3,77	3,75

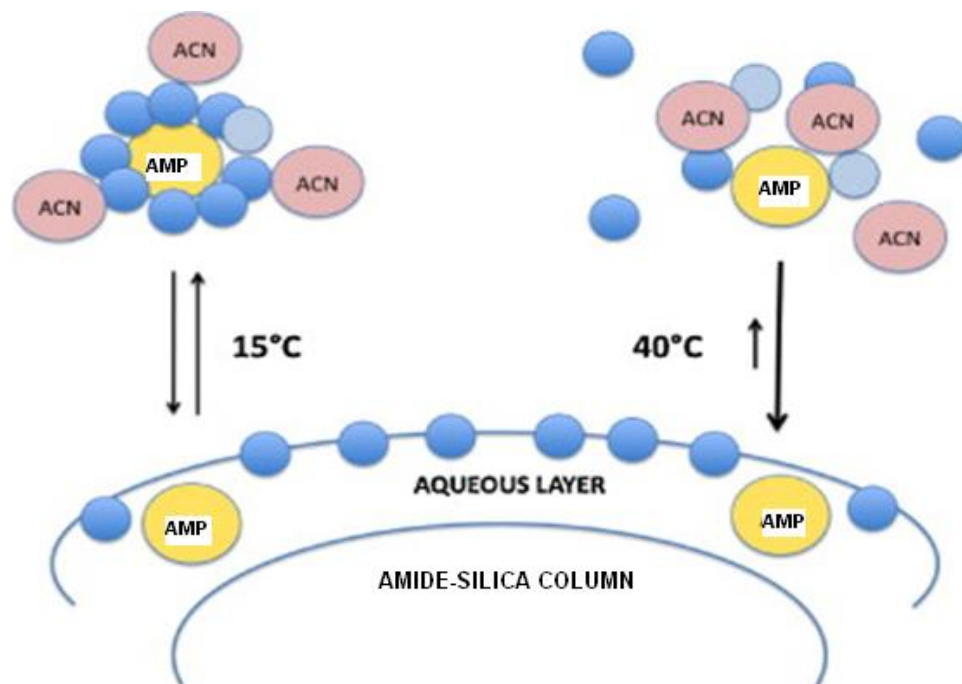
Η θερμοκρασία της στήλης επηρεάζει φυσικοχημικές παραμέτρους, όπως το ιξώδες της κινητής φάσης, το συντελεστή διάχυση, την ενθαλπία μεταφοράς των μορίων ενός αναλύτη μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης και τη μεταβολή της εντροπίας των μορίων κατά την αλληλεπίδρασή τους με τη στατική φάση, οι οποίες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

$$\ln k' = - \frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \varphi \quad (3.1)$$

όπου ΔH^0 και ΔS^0 , είναι η μεταβολή της ενθαλπίας και της εντροπίας μιας ένωσης κατά τη μεταφορά της από την κινητή στη στατική φάση, R, η παγκόσμια σταθερά των αερίων και φ , ο λόγος των φάσεων (ο λόγος του όγκου της στατικής φάσης προς τον όγκο της κινητής φάσης) [322]. Θεωρώντας ότι ο μηχανισμός στην HILIC λαμβάνει χώρα μέσω κατανομής, η γραφική απεικόνιση της εξίσωσης van't Hoff, $\ln k'$ συναρτήσει του $1/T$, θα πρέπει να είναι γραμμική [323]. Η ύπαρξη γραμμικής συσχέτισης είναι συνήθης στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, υποδεικνύοντας ότι η κατανομή είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός κατακράτησης των ενώσεων. Στη HILIC, αποκλίσεις από τη γραμμικότητα στην εξίσωση van't Hoff μπορούν να αποδοθούν στην ύπαρξη ενός "μικτού" μηχανισμού με τη συμμετοχή πολλών παραμέτρων [324, 325, 326]. Η εξήγηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με τον Alpert

(1990) σύμφωνα με τον οποίο η κατακράτηση των πολικών ενώσεων, πέραν της κατανομής, καθορίζεται από ένα συνδυασμό αλληλεπιδράσεων με τη μορφή επιμέρους μηχανισμών, όπως είναι η ιονανταλλαγή, οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου.

Σύμφωνα με τον Johnsen και τους συνεργάτες του [327], μία εξήγηση για τη συμπεριφορά αυτή των νουκλεοτιδίων, δηλαδή ότι προκαλούν αύξηση της κατακράτησης και ως εκ τούτου θετικές κλίσεις στην εξίσωση van't Hoff, είναι ότι τα υδρόφιλα νουκλεοτίδια σχηματίζουν ένα συγκρότημα με τα μόρια του νερού, προστατεύοντάς τα έτσι, από τον οργανικό διαλύτη της κινητής φάσης. Αυτό είναι ανάλογο με το σχηματισμό ενός υδρόφιλου στρώματος γύρω από τη στατική φάση [329]. Σε αυξημένες θερμοκρασίες, εικάζεται ότι καθίσταται ολοένα και πιο ευνοϊκός ο διαχωρισμός του συγκροτήματος (που σχηματίζει κάθε υδρόφιλο νουκλεοτίδιο με μόρια νερού) και τα νουκλεοτίδια είναι εκτεθειμένα στο ACN που είναι ο ασθενής διαλύτης. Κατά συνέπεια, η ισορροπία μετατοπίζεται προς την κατεύθυνση του περισσότερου υδρόφιλου στρώματος, δηλαδή στην επιφάνεια της στατικής φάσης (Σχήμα 3.2.1.15).



Σχήμα 3.2.1.15. Προτεινόμενος μηχανισμός της αύξησης της κατακράτησης των αναλυτών με την αύξηση της θερμοκρασίας, σύμφωνα με τον Johnsen και τους συνεργάτες του

Στον Πίνακα 3.2.1.10. παρατίθενται κατά προσέγγιση οι τιμές της ενθαλπίας για τα πέντε νουκλεοτίδια. Οι τιμές είναι θετικές και κυμαίνονται κοντά στα 45 kJ/mol. Αυτό σημαίνει ότι η κατακράτηση των ενώσεων, δηλαδή η μετακίνησή τους από την κινητή στη στατική φάση είναι μια ενδόθερμη διεργασία (ενεργειακά μη αυθόρμητη) και τα συστατικά κατακρατούνται περισσότερο καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία. [303, 329] επίσης, παρατηρείται ότι οι συντελεστές γραμμικής συσχέτισης κυμαίνονται από 0,981 έως 0,987. Το αποτέλεσμα αυτό αντικατοπτρίζει την απόκλιση από τη γραμμικότητα της εξίσωσης van't Hoff και ενισχύει την άποψη της ύπαρξης "μικτού" μηχανισμού με τη συμμετοχή πολλών παραμέτρων.

Πίνακας 3.2.1.10. Τιμές των συντελεστών γραμμικής συσχέτισης της ενθαλπίας και του λόγου $\Delta S^\circ/R$ της εξίσωσης van't Hoff.

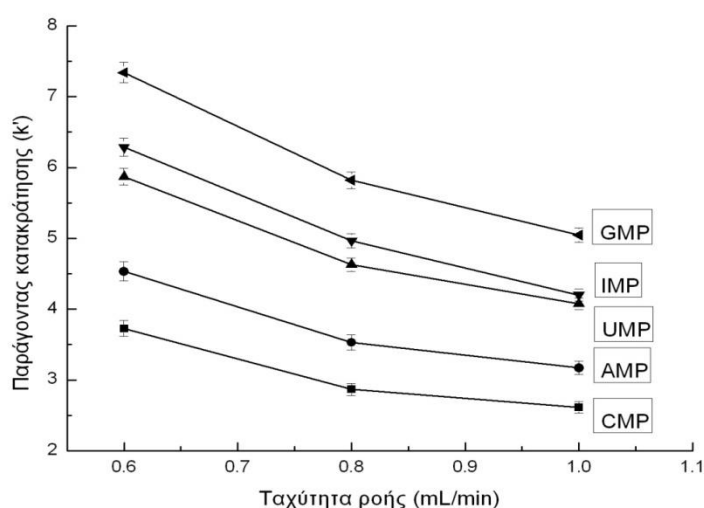
Ένωση	ACN/H ₂ O 75/25		
	R	$\Delta H^\circ(\text{kJ/mol})$	$\Delta S^\circ/R$
CMP	0,986	47	20,8
AMP	0,986	46	20,6
UMP	0,987	45	20,4
IMP	0,984	45	20,4
GMP	0,981	45	20,5

Με βάση, λοιπόν, την επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης στη διαχωριστική ικανότητα στο μίγμα των νουκλεοτιδίων στο εξεταζόμενο εύρος θερμοκρασιών και την απόκριση του ανιχνευτή DAD, η θερμοκρασία των 20°C επιλέχθηκε ως η βέλτιστη για τον διαχωρισμό του μίγματος των νουκλεοτιδίων.

3.2.1.8. Επίδραση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης

Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της HILIC είναι το χαμηλό ιξώδες της κινητής φάσης, λόγω της παρουσίας οργανικού διαλύτη σε υψηλά ποσοστά (>70%, (v/v), το οποίο επιτρέπει την εφαρμογή υψηλών ροών [77]. Εντούτοις, η αύξηση της ροής της κινητής φάσης πάνω από ένα όριο έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση της διαχωριστικής απόδοσης της στήλης [70]. Επίσης, η βελτιστοποίηση ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού στοχεύει στο να ικανοποιεί την εκλεκτικότητα, την ταχύτητα και τη διαχωριστική ικανότητα για μια δεδομένη ανάλυση [330]. Στο Σχήμα

3.2.1.16 παρατίθενται οι παράγοντες κατακράτησης (k') των νουκλεοτιδίων ως συνάρτηση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης. Όπως είναι αναμενόμενο, με τη μείωση του χρόνου κατακράτησης των ενώσεων παρατηρείται αύξηση της ροής της κινητής φάσης [70].



Σχήμα 3.2.1.16. Επίδραση του παράγοντα κατακράτησης (k') των νουκλεοτιδίων ως συνάρτηση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης, στον ισοκρατικό διαχωρισμό των νουκλεοτιδίων σε στήλη αμιδο-πυριτίας. Χρωματογραφικές συνθήκες:

Ποσοστό ACN: 75% (v/v),

Διαλύτης Α: [υδατικό διάλυμα HCOOH, 10 mM, pH 3.0]

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

Θερμοκρασία στήλης: 30°C, Ανιχνευτής: DAD

Σειρά έκλουσης νουκλεοτιδίων: CMP-AMP- UMP-IMP-GMP

Η αύξηση της ροής της κινητής φάσης από 0,6 στα 1,0 mL/min έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση του συνολικού χρόνου ανάλυσης του μίγματος από τα 25 στα 17 min. Ταυτόχρονα όμως, λαμβάνει χώρα μείωση της διαχωριστικής ικανότητας στο μίγμα των νουκλεοτιδίων. Οι τιμές της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης για ζεύγη αναλυτών δίνονται στον Πίνακα 3.2.1.11 και είναι εμφανές ότι σε ροή κινητής φάσης 1,0 mL/min, η διαχωριστική ικανότητα των ζευγών νουκλεοτιδίων μειώνεται, όμως εξακολουθεί να υφίσταται διαχωρισμός. Για το λόγο αυτό, η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης που τελικά επιλέγεται είναι ίση προς 1,0 mL/min. Μεγαλύτερες ροές

για επιτάχυνση της διαδικασίας χρωματογράφησης δεν ενδείκνυνται διότι δεν πραγματοποιείται διαχωρισμός των νουκλεοτιδίων ($R_s < 1$).

Πίνακας 3.2.1.11. Τιμές διαχωριστικής ικανότητας της στήλης στο μίγμα νουκλεοτιδίων, σε ροή κινητής φάσης 0,6, 0,8 και 1,0 mL/min και αναλογία διαλύτη έκλουσης ACN/H₂O 70/10 (v/v). Η κινητή φάση περιέχει HCOOH 10 mM, pH 3,0 (χρωματογραφικές συνθήκες, όπως στο Σχήμα 3.2.1.16).

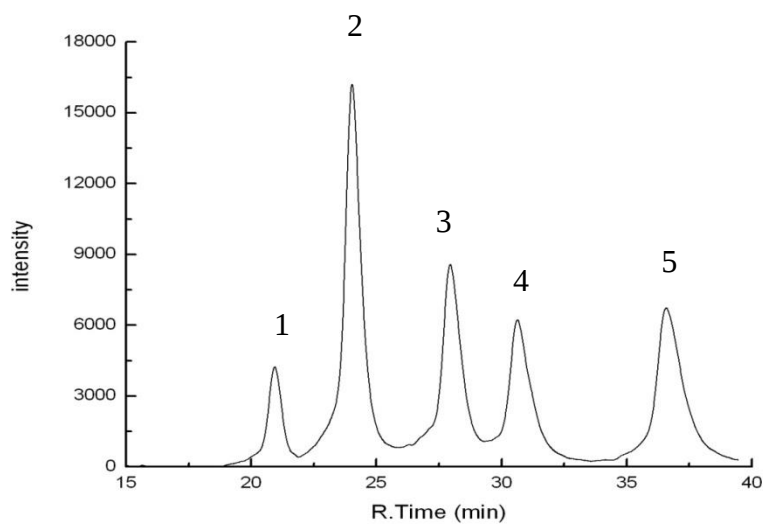
Ζεύγος αναλυτών	Διαχωριστική ικανότητα, R_s		
	0,6 mL/min	0,8 mL/min	1,0 mL/min
CMP / AMP	3,37	3,12	2,94
AMP/ UMP	4,57	4,28	4,14
UMP / IMP	1,17	1,08	1,06
IMP/ GMP	2,63	2,43	2,28

Τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν τη δυνατότητα της HILIC ως ένα βασικό στάδιο της χημικής ανάλυσης, για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό ενώσεων όπως τα νουκλεοτίδια, υπό συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι βέλτιστες συνθήκες στην υγρή χρωματογραφία είναι οι ακόλουθες:

- Χρωματογραφική στήλη: αμιδο-πυριτία (μήκος της στήλης: 15 cm, εσωτερική διάμετρος: 4,6 mm, μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης: 5 μm)
- Κινητή φάση: ACN:H₂O - HCOOH 10 mM, pH 3,0, με αναλογία 75:25, ισοκρατική έκλυση
- Ροή της κινητής φάσης: 1.0 mL/min
- Θερμοκρασία στήλης: 20 °C
- Όγκος έγχυσης: 20 mL
- Μήκη κύματος: 260-300 nm
- Χρόνος ανάλυσης: 40 min

Στο Σχήμα 3.2.1.17. παρατίθεται ένα χρωματογράφημα νουκλεοτιδίων συγκέντρωσης 20 mg/mL, υπό τις βέλτιστες συνθήκες που προαναφέρθηκαν.



Σχήμα 3.2.1.17. Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα προτύπου διαλύματος νουκλεοτιδίων συγκέντρωσης 20 mg/mL, στις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες. Σειρά έκλουσης: (1) CMP, (2) AMP, (3) UMP, (4) IMP και (5) GMP

3.2.2. ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΕΡΑΜΙΚΕΣ ΙΝΕΣ ΑΛΟΥΜΙΝΑΣ ΚΑΙ ΣΤΑΝΝΙΑΣ- ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ

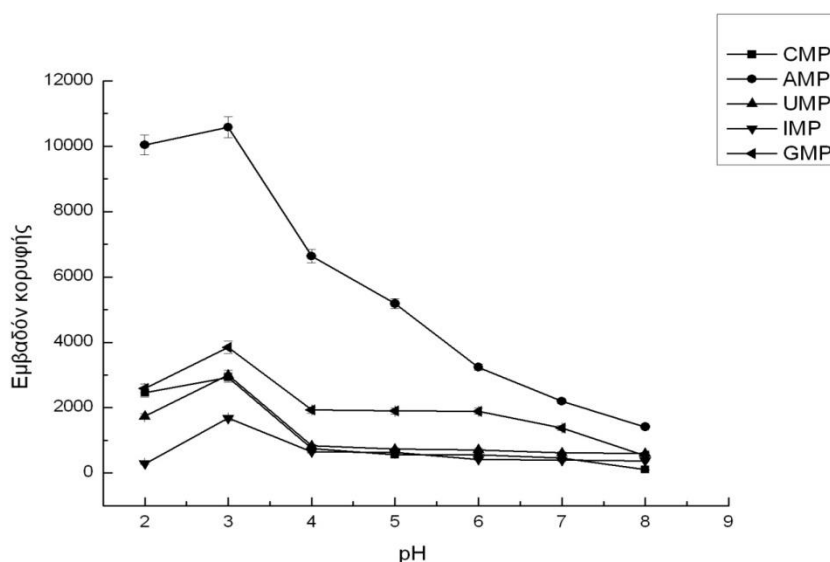
Η προσυγκέντρωση των νουκλεοτιδίων στα κεραμικά υλικά αλουμίνας και σταννίας μελετήθηκε σε υδατικά πρότυπα διαλύματα των υπό μελέτη νουκλεοτιδίων. Οι παράμετροι βελτιστοποίησης προσυγκέντρωσης και έκλουσης των νουκλεοτιδίων στα κεραμικά υλικά είναι οι εξής:

- pH του διαλύματος των νουκλεοτιδίων
- ταχύτητα ανάδευσης του διαλύματος των νουκλεοτιδίων παρουσία των ινών
- θερμοκρασία προσυγκέντρωσης των νουκλεοτιδίων
- χρόνος ανάδευσης του διαλύματος των νουκλεοτιδίων στη προσυγκέντρωση
- όγκος του διαλύματος των νουκλεοτιδίων για σταθερή συγκέντρωση αναλυτών
- όγκος του διαλύματος των νουκλεοτιδίων για σταθερή ποσότητα αναλυτών
- αριθμός των ινών σε διάλυμα των νουκλεοτιδίων για σταθερή ποσότητα αναλυτών
- συνθήκες έκλουσης των νουκλεοτιδίων από την ίνα

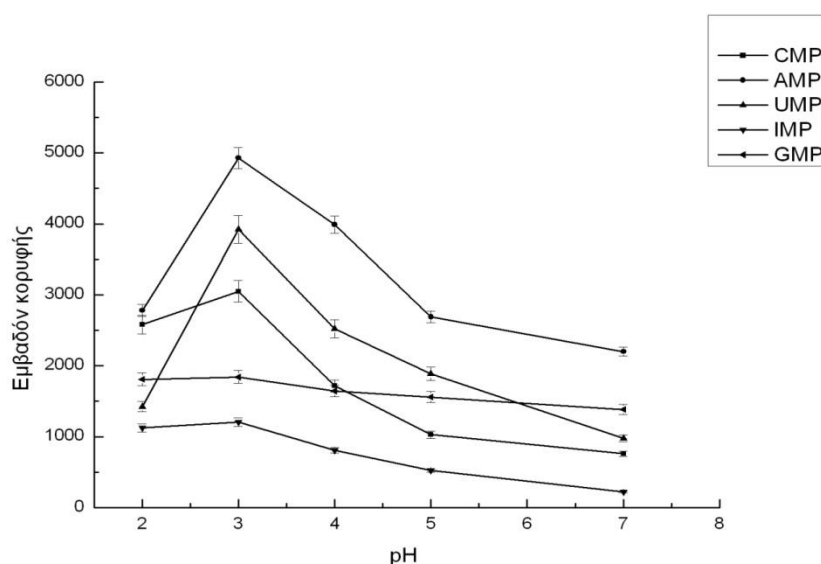
3.2.2.1. Επίδραση του pH του διαλύματος των νουκλεοτιδίων

Η αλουμίνα και η σταννία είναι οξέα κατά Lewis και αντιδρούν με βάσεις κατά Lewis, όπως είναι οι φωσφονικές ομάδες των νουκλεοτιδίων. Το pH του διαλύματος επηρεάζει την ικανότητα δημιουργίας δεσμού μεταξύ των νουκλεοτιδίων και των κεραμικών υλικών. Μάλιστα, η γεωμετρία των κεραμικών υλικών (π.χ., α - Al_2O_3 , γ - Al_2O_3) επηρεάζει το βαθμό της προσυγκέντρωσης. Λόγω της υδρόλυσης της αλουμίνας και της σταννίας στην εξωτερική τους επιφάνεια, στις κεραμικές ίνες εμφανίζονται οι ομάδες Al-OH και Sn-OH . Με τη μορφή αυτή, η αλουμίνα και η σταννία αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τις φωσφονικές ομάδες των νουκλεοτιδίων σχηματίζοντας μονοδοντικούς, διδοντικούς και τριδοντικούς δεσμούς. Σύμφωνα με τα παραπάνω, (βλέπε και εισαγωγή §1.8) οι ίνες των κεραμικών υλικών σε υδατικό διάλυμα αποτελούνται από υδροξυλομάδες, οι οποίες ανάλογα με το pH του διαλύματος μπορεί να είναι πρωτονιωμένες ή αποπρωτονιωμένες. Οι χαμηλές τιμές pH οδηγούν σε πρωτονιωμένες υδροξυλομάδες, δηλαδή, σε ισχυρά οξέα κατά Lewis, σχηματίζοντας ισχυρούς δεσμούς με τις φωσφονικές ομάδες των νουκλεοτιδίων.

Για τη μελέτη της προσυγκέντρωσης των νουκλεοτιδίων στα κεραμικά υλικά σε σχέση με το pH χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα νουκλεοτιδίων σε περιοχή pH από 2,0 έως 10,0, με τη χρήση υδροχλωρικού οξέος (pH 2,0), οξικού οξέος και υδροξειδίου του νατρίου. Η επίδραση του pH του διαλύματος στην προσυγκέντρωση των νουκλεοτιδίων σε ίνες αλουμίνας και σταννίας, δίνεται στο Σχήμα 3.2.2.1.1. και 3.2.2.1.1. αντίστοιχα.



Σχήμα 3.2.2.1.1. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του pH του διαλύματος των νουκλεοτιδίων στην προσυγκέντρωση σε ίνα αλουμίνας



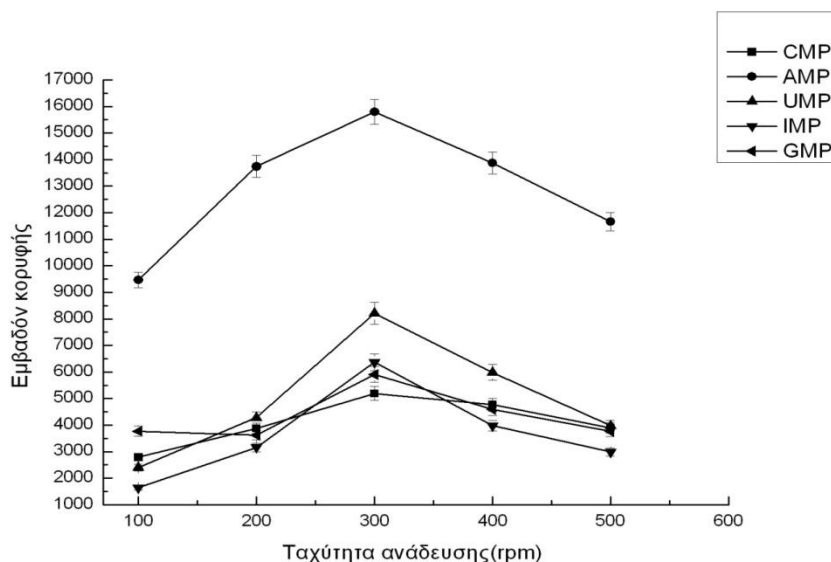
Σχήμα 3.2.2.1.2. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του pH του διαλύματος των νουκλεοτιδίων στην προσυγκέντρωση σε ίνα σταννίας

Σημαντικό ρόλο στη βελτιστοποίηση της προσυγκέντρωσης παίζει το σημείο μηδενικού φορτίου (point of zero charge) κάθε υλικού, τα οποία μετρήθηκαν και είναι 6,2 για την αλουμίνα και 5,9 για την σταννία (Πειραματικό μέρος §2.5.4.). Κάτω από αυτές τις τιμές pH οι επιφάνειες φορτίζονται θετικά και έλκουν τα νουκλεοτίδια, τα οποία βρίσκονται στην ανιοντική τους μορφή. Σύμφωνα με το παράρτημα Γ, όπου δίνονται τα διαγράμματα κατανομής, παρατηρείται ότι σε pH 3,0 τα AMP και GMP είναι διπρωτονιωμένα, τα CMP και UMP είναι μονοπρωτονιωμένα και το IMP είναι πλήρως αποπρωτονιωμένο. Συμπερασματικά, το pH=3 είναι το βέλτιστο όπου πραγματοποιείται η καλύτερη αλληλεπίδραση μεταξύ της επιφάνειας των ινών και των αποπρωτονιωμένων νουκλεοτιδίων.

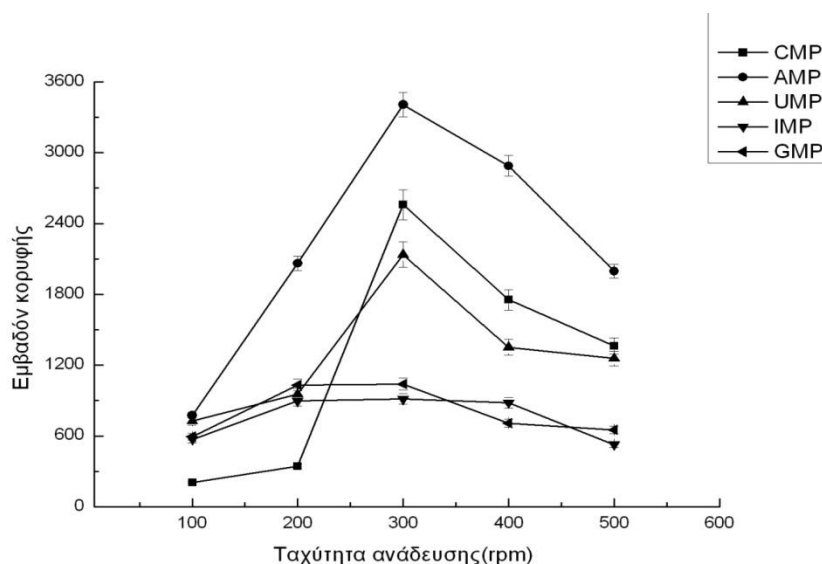
3.2.2.2. Επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης του διαλύματος των νουκλεοτιδίων παρουσία των ινών

Στη διαδικασία προσυγκέντρωσης είναι απαραίτητη η ανάδευση του διαλύματος των νουκλεοτιδίων με τις ίνες αλουμίνας και σταννίας. Όταν η ανάδευση πραγματοποιήθηκε με μαγνητικό αναδευτήρα, παρατηρήθηκε θραύση των ινών και η συλλογή τους στο τέλος της διαδικασίας προσυγκέντρωσης ήταν από δύσκολη έως αδύνατη. Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα αυτό έγινε χρήση περιστροφικού αναδευτήρα, με ταχύτητες ανάδευσης από 100 έως 500 rpm. Στα Σχήματα 3.2.2.2.1 και 3.2.2.2.2. παρατίθενται τα αποτελέσματα της ταχύτητας ανάδευσης ινών αλουμίνας και σταννίας αντίστοιχα σε υδατικά διαλύματα νουκλεοτιδίων.

Η απόδοση προσυγκέντρωσης αυξάνεται με την ταχύτητα ανάδευσης μέχρι τα 300 rpm, ενώ στη συνέχεια έχουμε μείωση αυτής, όταν η ταχύτητα ανάδευσης φτάνει τα 500 rpm. Κατά την ανάδευση του διαλύματος η ίνα ανακινείται ελεύθερα στο διάλυμα. Έως τα 300 rpm η εξωτερική ταχύτητα μεταφοράς μάζας των νουκλεοτιδίων αυξάνεται και η ισορροπία επιτυγχάνεται γρήγορα. Ωστόσο, όταν η ταχύτητα ανάδευσης αυξάνεται πάνω από 300 rpm, η ταχύτητα διάχυσης μειώνεται. Αυτό μπορεί να συμβαίνει διότι λόγω της υψηλής ταχύτητας διαταράσσεται η ισορροπία κατά την προσρόφιση των νουκλεοτιδίων και της επιφάνειας των ινών, μειώνοντας την προσυγκέντρωσή τους στις ίνες. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η ταχύτητα των 300 rpm επιλέχθηκε ως η βέλτιστη για την πραγματοποίηση των πειραμάτων.



Σχήμα 3.2.2.2.1. Γραφική απεικόνιση της ταχύτητας ανάδευσης του διαλύματος των νουκλεοτιδίων σε ένα αλουμίνας

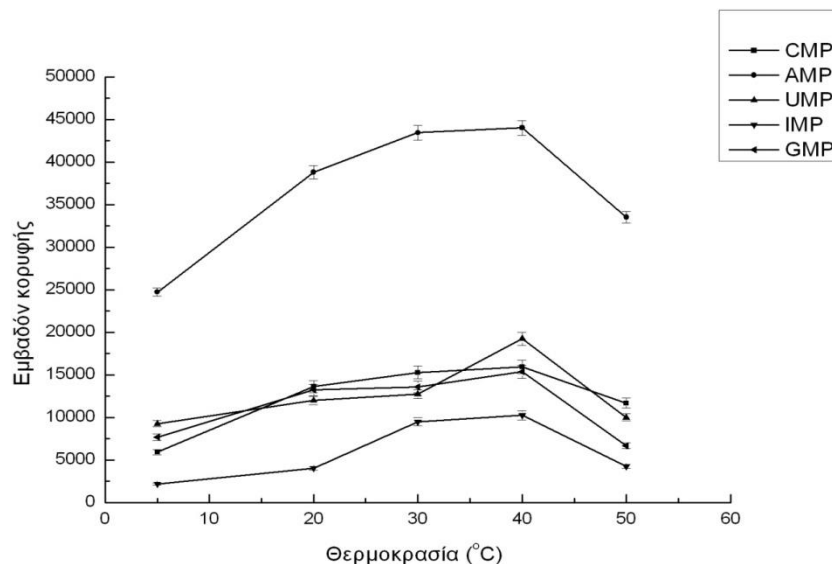


Σχήμα 3.2.2.2.2. Γραφική απεικόνιση της ταχύτητας ανάδευσης του διαλύματος των νουκλεοτιδίων σε ένα στανίας

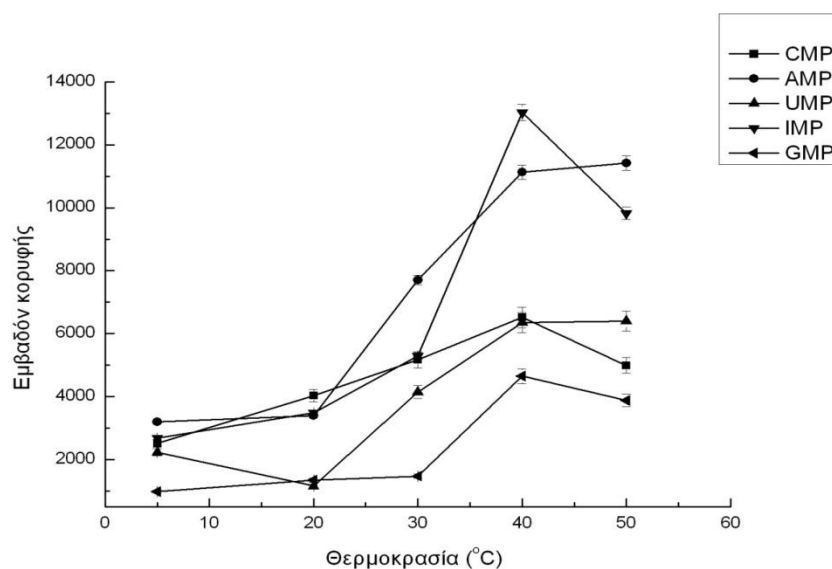
3.2.2.3. Επίδραση της θερμοκρασίας στην προσυγκέντρωση των νουκλεοτιδίων

Η επίδραση της θερμοκρασίας του διαλύματος των νουκλεοτιδίων κατά τη διάρκεια της προσυγκέντρωσης μελετήθηκε στις κεραμικές ίνες αλουμίνας και στανίας, σε pH 3,0 και τα αποτελέσματα παρατίθενται στα Σχήματα 3.2.2.3.1. και 3.2.2.3.2.. Η επίδραση της θερμοκρασίας μελετήθηκε σε ένα εύρος από 5 έως 50 °C. Η προσυγκέντρωση των ινών αυξάνεται μέχρι τους 40 °C, όπου παρατηρείται η

μέγιστη προσυγκέντρωση, καθώς ευνοείται η διάχυση των αναλυτών του δείγματος προς τις επιφάνειες των κοίλων ινών αλουμίνας και στανίας. Σε θερμοκρασίες υψηλότερες από τους 40°C η προσυγκέντρωση μειώνεται, πιθανότατα λόγω της αποδόμησης των νουκλεοτιδίων [339].



Σχήμα 3.2.2.3.1. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης της θερμοκρασίας του διαλύματος των νουκλεοτιδίων στην προσυγκέντρωση σε ίνα αλουμίνας



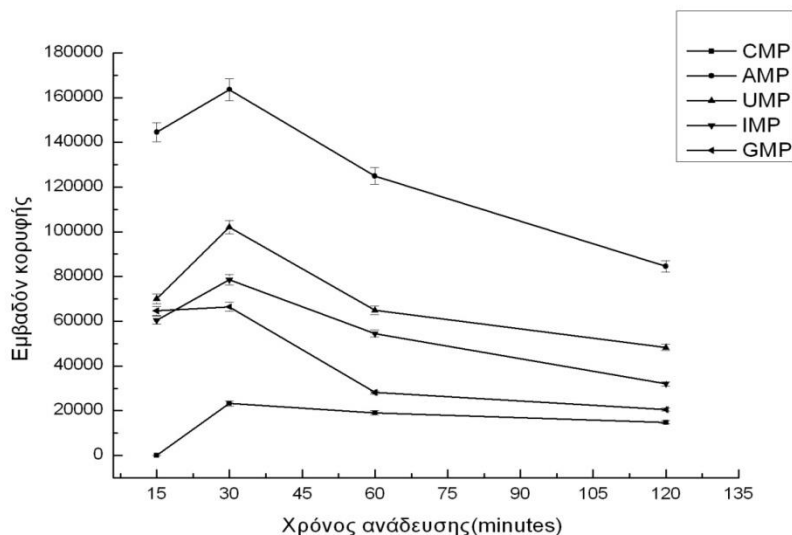
Σχήμα 3.2.2.3.2. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης της θερμοκρασίας του διαλύματος των νουκλεοτιδίων σε ίνα στανίας

Σύμφωνα με τα παραπάνω η θερμοκρασία των 40 °C επιλέχθηκε ως η βέλτιστη για την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

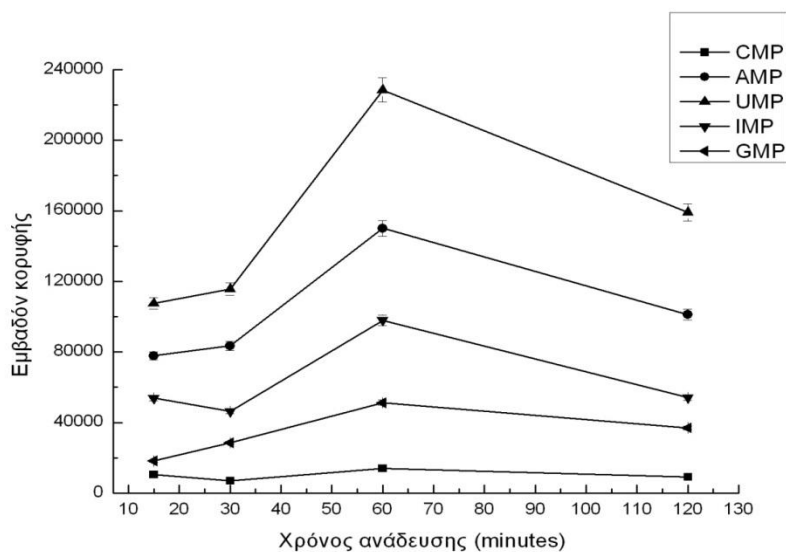
3.2.2.4. Επίδραση του χρόνου ανάδευσης του διαλύματος των νουκλεοτιδίων στην προσυγκέντρωση

Η μελέτη της επίδρασης του χρόνου ανάδευσης του διαλύματος των νουκλεοτιδίων με τις ίνες πραγματοποιήθηκε σε pH 3,0 και σε ταχύτητα ανάδευσης 300 rpm, όπου λαμβάνει χώρα η βέλτιστη προσυγκέντρωση των νουκλεοτιδίων στις ίνες. Ο χρόνος ανάδευσης μελετήθηκε από 15 έως 120 min. Στα Σχήματα 3.2.2.4.1. και 3.2.2.4.2. απεικονίζεται η επίδραση του χρόνου ανάδευσης (15, 30, 60, 120 min) στην προσυγκέντρωση διαλυμάτων νουκλεοτιδίων με ίνες αλουμίνας και σταννίας αντίστοιχα.

Η ποσότητα των νουκλεοτιδίων που προσροφάται στις ίνες εξαρτάται από τη συγγένεια των νουκλεοτιδίων με το υλικό κατασκευής των κοίλων ινών και από το χρόνο επαφής. Στην ίνα της αλουμίνας παρατηρείται ότι όλα τα νουκλεοτίδια έχουν την ίδια συμπεριφορά. Συγκεκριμένα, προσροφούνται στην ίνα μέχρι τα 30 min, ενώ μετά από το χρόνο αυτό εκροφώνται από αυτήν. Σε αντίθεση με την ίνα αλουμίνας, στην ίνα σταννίας τα νουκλεοτίδια τα νουκλεοτίδια UMP, AMP και GMP παρουσιάζουν αύξηση της προσρόφησής τους με την πάροδο του χρόνου έως τα 60 min και μετά εκροφώνται. Τα CMP και IMP προσροφούνται στην επιφάνεια της ίνας στα πρώτα 15 min και λόγω της συνεχής ανακίνησης του διαλύματος και της ίνας εκροφώνται μερικώς από αυτήν στα 30 min, μια διαδικασία που εξελίσσεται έως τα 60 και 120 min αντίστοιχα.



Σχήμα 3.2.2.4.1. Γραφική απεικόνιση του χρόνου ανάδευσης του διαλύματος των νουκλεοτιδίων σε ίνα αλουμίνας



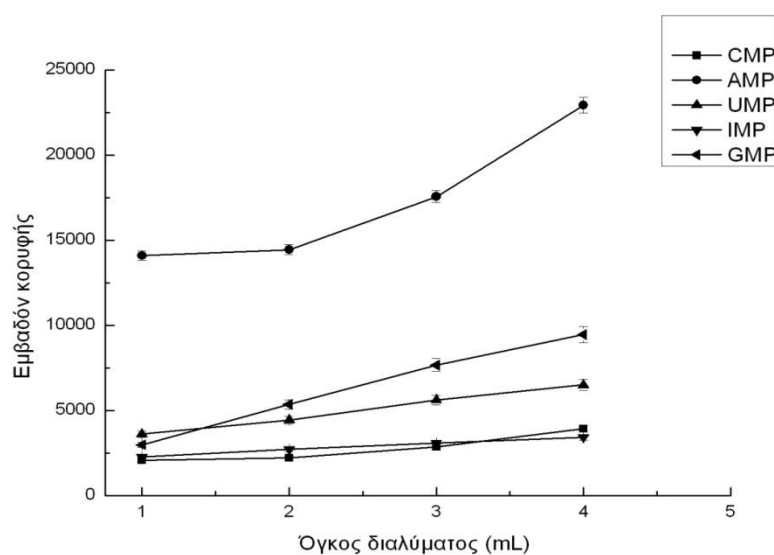
Σχήμα 3.2.2.4.2. Γραφική απεικόνιση του χρόνου ανάδευσης του διαλύματος των νουκλεοτιδίων σε ίνα σταννίας

Συμπερασματικά, η κάθε κοίλη ίνα απαιτεί διαφορετικό χρόνο ανάδευσης με τα νουκλεοτίδια για να επιτευχθεί η μέγιστη προσυγκέντρωση, πιθανόν λόγω των διαφορετικών δεσμών που σχηματίζονται κατά την εκχύλιση (δηλαδή, η αλουμίνα, σχηματίζει ισχυρότερους δεσμούς - περισσότερους τριδοντικούς - από ότι η σταννία - περισσότερους μονοδοντικούς). Έτσι, τα 30 min ανακίνησης είναι αρκετά

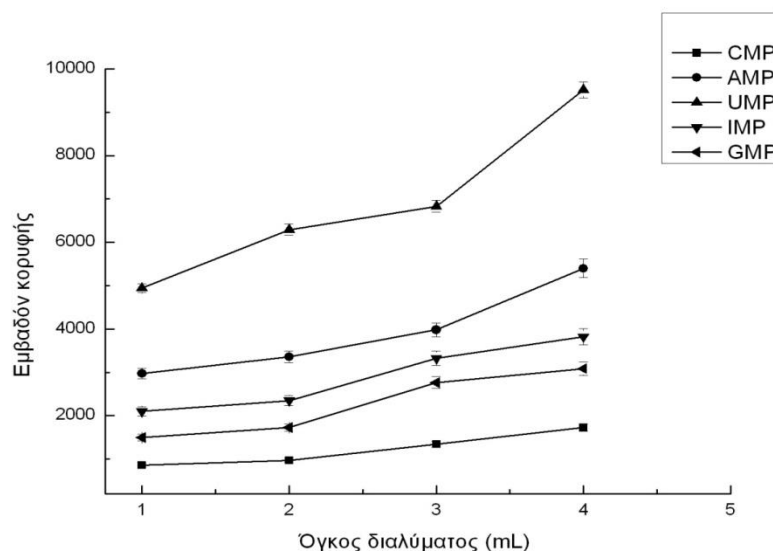
για την ίνα της αλουμίνας, ενώ για την ίνα της σταννίας, όπου η προσρόφηση των νουκλεοτιδίων αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου επιλέγεται ο χρόνος των 60 min

3.2.2.5. Επίδραση του όγκου διαλύματος των νουκλεοτιδίων για σταθερή συγκέντρωση αναλυτών

Μελετήθηκε ο όγκος του διαλύματος των νουκλεοτιδίων κατά την προσυγκέντρωση στις κεραμικές ίνες αλουμίνας και σταννίας. Συγκεκριμένα, η προσυγκέντρωση πραγματοποιήθηκε σε όγκους δείγματος 1,0 έως 4,0 mL, τα οποία περιέχουν την ίδια συγκέντρωση νουκλεοτιδίων, 20 mg/mL. Παρατηρήθηκε ότι καθώς αυξάνεται ο όγκος του δείγματος, αυξάνεται και η προσυγκέντρωση των αναλυτών στην κάθε ίνα οξειδίου μετάλλου (Σχήματα 3.2.2.5.1 και 3.2.2.5.2). Όμως, δεδομένου ότι ο όγκος του δείγματος θα μπορούσε να είναι ένας περιοριστικός παράγοντας στην ανάλυση, ειδικά για το ανθρώπινο μητρικό γάλα και με δεδομένο ότι οι συγκεντρώσεις των νουκλεοτιδίων είναι ποσοτικοποιήσιμες με τη χρήση μικρών όγκων, μια διαδικασία εκχύλισης με 2 mL δείγματος είναι εφικτή.



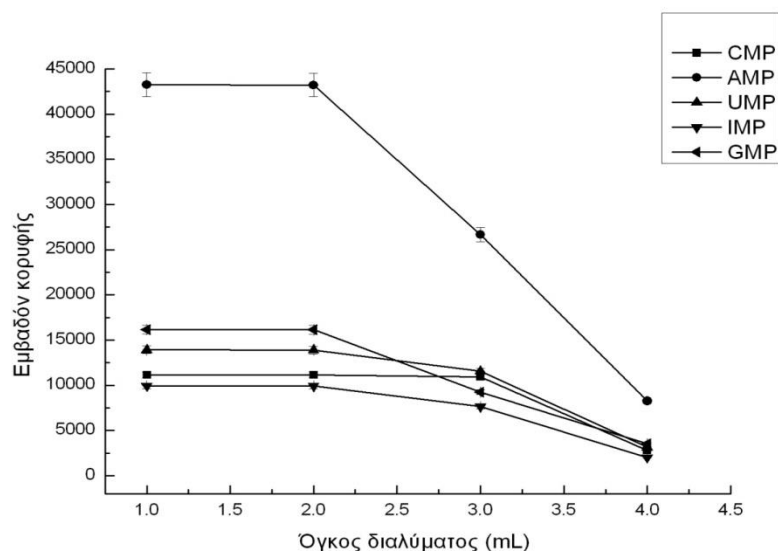
Σχήμα 3.2.2.5.1. Γραφική απεικόνιση του όγκου διαλύματος των νουκλεοτιδίων για σταθερή συγκέντρωση αναλυτών (20 mg/mL) σε ίνα αλουμίνας



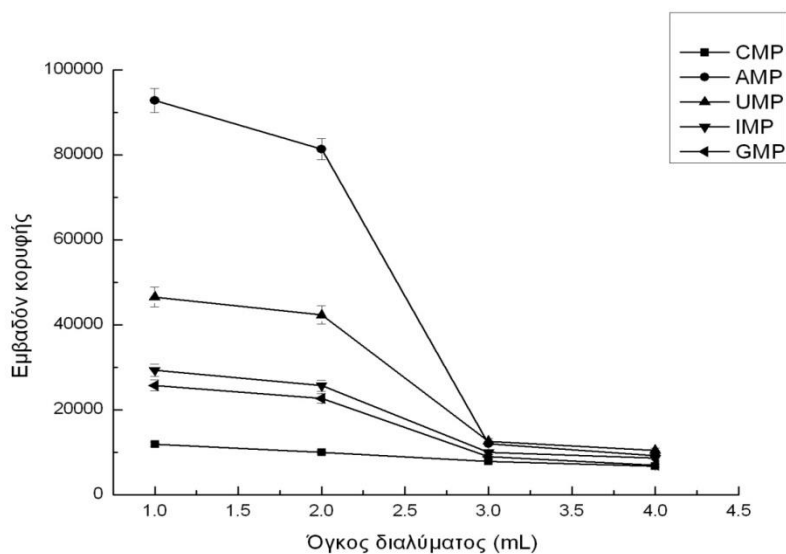
Σχήμα 3.2.2.5.2. Γραφική απεικόνιση του όγκου διαλύματος των νουκλεοτιδίων για σταθερή συγκέντρωση αναλυτών (20 mg/mL) σε ίνα σταννίας

3.2.2.6. Επίδραση του όγκου του διαλύματος των νουκλεοτιδίων για σταθερή ποσότητα αναλυτών

Μελετήθηκε ο όγκος του διαλύματος των νουκλεοτιδίων κατά την προσυγκέντρωση στις κεραμικές ίνες αλουμίνας και σταννίας. Συγκεκριμένα, η προσυγκέντρωση πραγματοποιήθηκε σε όγκους δείγματος μεταξύ 1,0 και 4,0 ml, τα οποία περιέχουν την ίδια ποσότητα νουκλεοτιδίων. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι καθώς αυξάνεται ο όγκος του δείγματος μειώνεται η συγκέντρωσή του. Στα Σχήματα 3.2.2.6.1 και 3.2.2.6.2. παρατίθενται τα γραφήματα της επίδρασης του διαφορετικού όγκου διαλύματος νουκλεοτιδίων (υπό σταθερή ποσότητα) στην προσυγκέντρωση ίνας αλουμίνας και σταννίας αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι οι ίνες παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά στην προσρόφηση των νουκλεοτιδίων. Αναλυτικότερα, για όγκο δείγματος 1 mL παρατηρείται η υψηλότερη απόδοση εκχύλισης. Αυξάνοντας τον όγκο από το 1 mL στα 2 mL η απόδοσης της προσυγκέντρωσης είναι σταθερή (ίνα αλουμίνας) ή εμφανίζει μία μικρή τάση μείωσης (ίνα σταννίας). Καθώς αυξάνεται ο όγκος του δείγματος, από τα 2 στα 4 mL η απόδοση προσυγκέντρωσης των αναλυτών στις ίνες των οξειδίων των μετάλλων μειώνεται εμφανώς.



Σχήμα 3.2.2.6.1. Γραφική απεικόνιση του όγκου διαλύματος των νουκλεοτιδίων για σταθερή ποσότητα αναλυτών, σε ίνα αλουμίνας



Σχήμα 3.2.2.6.1. Γραφική απεικόνιση του όγκου διαλύματος των νουκλεοτιδίων για σταθερή ποσότητα αναλυτών, σε ίνα σταννίας

3.2.2.7. Επίδραση του αριθμού των ινών σε διάλυμα των νουκλεοτιδίων για σταθερή ποσότητα αναλυτών

Μελετήθηκε ο αριθμός των συντιθέμενων ινών που απαιτούνται για προσυγκέντρωση των νουκλεοτιδίων και καθαρισμό (clean-up) του δείγματος. Χρησιμοποιήθηκαν μία, δύο και τρεις κοίλες ίνες μήκους ~1 cm η καθεμία.

Παρατηρήθηκε ότι η μία ίνα είναι αρκετή για την μέγιστη προσυγκέντρωση των νουκλεοτιδίων, ακόμα και σε υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης, 20 mg/mL. Αυτό είναι σε σχετική συμφωνία με το παραπάνω πείραμα αύξησης του όγκου του δείγματος σε σταθερή συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων. Συμπερασματικά, για τις συγκεντρώσεις που μελετούνται επιλέγεται μία ίνα.

3.2.2.8. Συνθήκες έκλουσης των νουκλεοτιδίων από την ίνα αλουμίνας και σταννίας

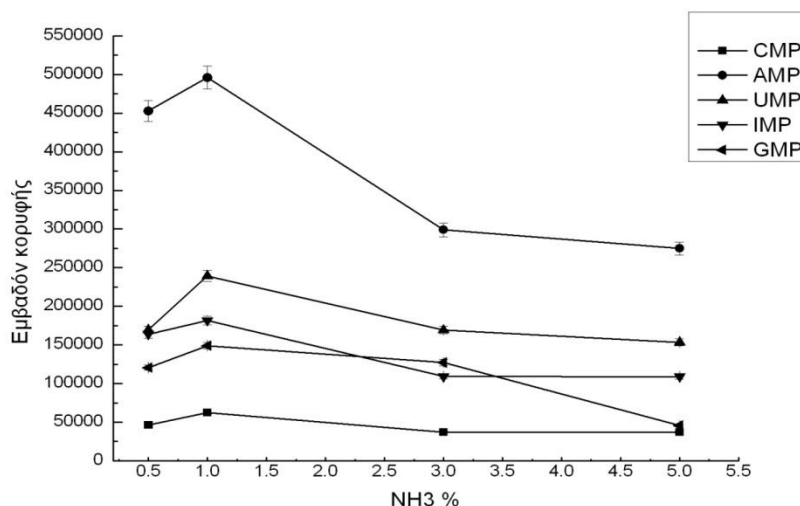
Σε χαμηλό pH τα οξείδια των μετάλλων παρουσιάζουν χαρακτηριστικά οξέων κατά Lewis, που οδηγούν στην ισχυρή αλληλεπίδραση των επιφανειών τους με ανιόντα, όπως είναι οι φωσφονικές ομάδες των οργανοφωσφορικών ενώσεων. Η δέσμευση των φωσφονικών ομάδων σε οξείδια μετάλλων μετάπτωσης, όπως το Sn, θα ήταν λογικό να συμβεί σε χαμηλό pH και η διακοπή αυτών των αλληλεπιδράσεων θα μπορούσε να επιτευχθεί με μια μετατόπιση του pH προς τις βασικές συνθήκες. Ως εκ τούτου, μελετήθηκαν συνθήκες έκλουσης με βάση το αλκαλικό pH για διαφορετική σύσταση του διαλύτη έκλουσης.

3.2.2.8.1 Επίδραση της σύστασης του διαλύτη έκλουσης

Μελετήθηκαν διάφορες συστάσεις του διαλύτη έκλουσης με χρήση υπερήχων, για συγκεκριμένο χρόνο (Ενότητα §3.2.2.8.3.). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η έκλουση σε υδατικά διαλύματα αμμωνίας συγκεντρώσεων 0,5, 1, 3 και 5%. Στη συνέχεια έγινε πραγματοποιήθηκε έκλουση με μεθανολικά διαλύματα αμμωνίας συγκεντρώσεων 0,5, 1, 3 και 5%. Οι συγκεντρώσεις που δίνουν τα βέλτιστα αποτελέσματα έκλουσης των νουκλεοτιδίων (η μία από το υδατικό διάλυμα και η άλλη από το μεθανολικό διάλυμα) συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Να σημειωθεί ότι τα βέλτιστα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με υδατικό και μεθανολικό διάλυμα TFA 1% (όξινο pH), ώστε να αποδειχθεί ότι δεν υφίσταται εκρόφιση σε τέτοιες συνθήκες. Στα Σχήματα 3.2.2.8.1., 3.2.2.8.2. και 3.2.2.8.3. που ακολουθούν παρατίθενται τα γραφήματα έκλουσης των νουκλεοτιδίων από την ίνα αλουμίνας και στα Σχήματα 3.2.2.8.4., 3.2.2.8.5. και 3.2.2.8.6 παρατίθενται τα γραφήματα έκλουσης των νουκλεοτιδίων από την ίνα σταννίας αντίστοιχα.

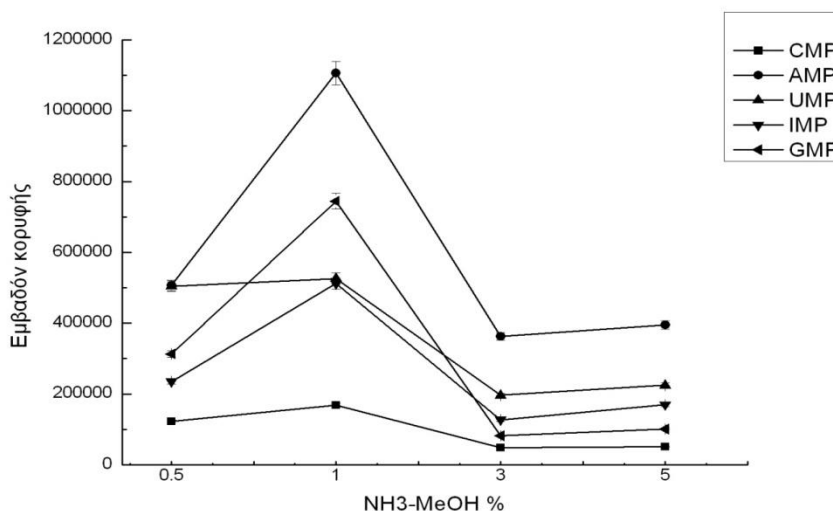
Η έκλουση των νουκλεοτιδίων από την επιφάνεια της ίνας με υδατικό διάλυμα αμμωνίας δείχνει ότι αυξάνοντας την συγκέντρωση της αμμωνίας από 0,5 σε 1% αυξάνεται και η έκλουση των νουκλεοτιδίων από την ίνα. Αυτό συμβαίνει διότι η

αμμωνία προσροφάται σε οξείδια των μετάλλων όπως η ζirkονία και έχει αναφερθεί ότι σχηματίζει δεσμούς [333]. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης της αμμωνίας σε 3 και 5% οδηγεί σε μείωση της έκλουσης των νουκλεοτιδίων από την ίνα. Συμπερασματικά, η συγκέντρωση 1% είναι η βέλτιστη σε σύγκριση με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις της υδατικής αμμωνίας.



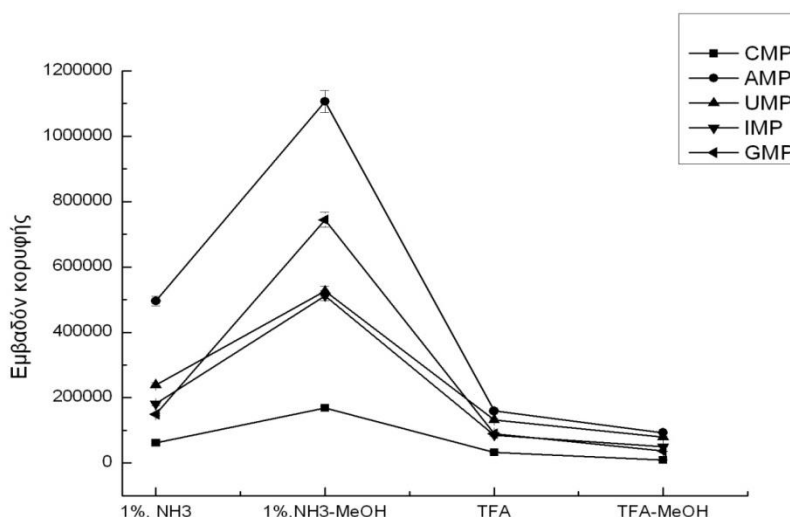
Σχήμα 3.2.2.8.1. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του υδατικού διαλύματος αμμωνίας στην έκλουση των νουκλεοτιδίων από ίνα αλουμίνιας.

Η έκλουση των νουκλεοτιδίων από τη επιφάνεια της ίνας με μεθανολικό διάλυμα αμμωνίας παρουσιάζει παρόμοια αποτελέσματα με υδατικό διάλυμα αμμωνίας. Οπότε, αυξάνοντας την συγκέντρωση της αμμωνίας από 0,5 σε 1% αυξάνεται και η έκλουση των νουκλεοτιδίων από την ίνα, ενώ περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης της αμμωνίας σε 3 και 5% οδηγεί σε μείωση της έκλουσης των νουκλεοτιδίων από την ίνα. Έτσι, η συγκέντρωση 1% μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας είναι η επιλεγόμενη ανάμεσα από τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις



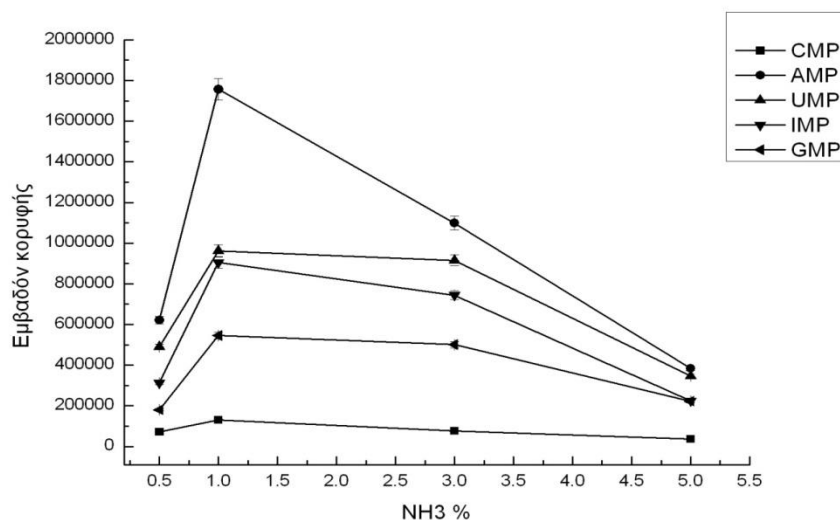
Σχήμα 3.2.2.8.2. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας στην έκλουση των νουκλεοτιδίων από ίνα αλουμίνιας.

Όπως προαναφέρθηκε, μελετήθηκαν υδατικά και μεθανολικά διαλύματα αμμωνίας διαφόρων συγκεντρώσεων, από τα οποία το υδατικό και το μεθανολικό διάλυμα αμμωνίας 1% είχε τα βέλτιστα αποτελέσματα. Ακολουθώς, συγκρίθηκαν τα δύο αυτά διαλύματα μεταξύ τους αλλά και με δύο διαλύματα TFA 1% (υδατικό και μεθανολικό διάλυμα) (Σχήμα 3.2.3.8.3.). Παρατηρείται ότι το μεθανολικό διάλυμα αμμωνίας 1% παρουσιάζει την βέλτιστη έκλουση των νουκλεοτιδίων από την ίνα αλουμίνιας, ενώ τα διαλύματα του TFA όπως ήταν αναμενόμενο, δεν ευνοούν την εκρόφιση των νουκλεοτιδίων.

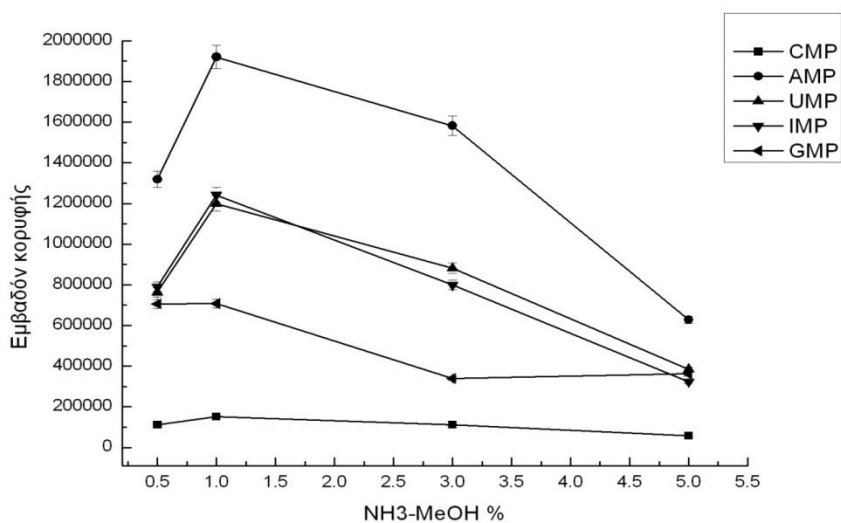


Σχήμα 3.2.2.8.3. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης διαλύματος 1% αμμωνίας (υδατικού και μεθανολικού) και διαλύματος 1% TFA (υδατικού και μεθανολικού)

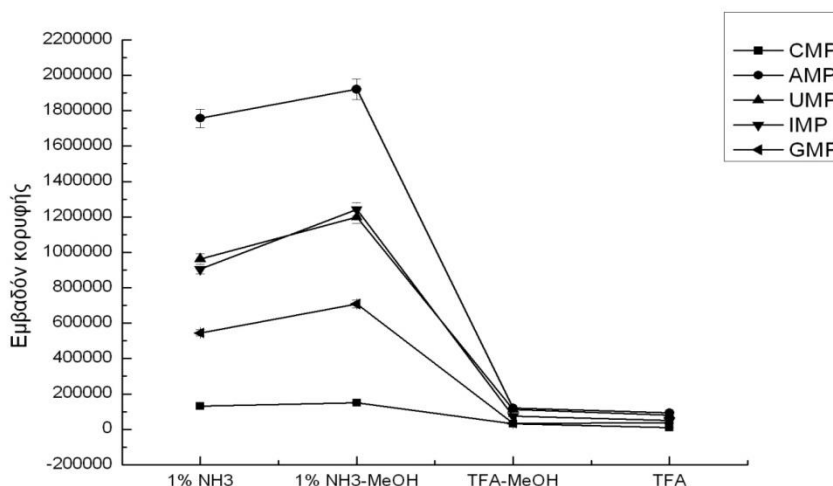
Η μελέτη της εκρόφησης των νουκλεοτιδίων από την ίνα της σταννίας πραγματοποιήθηκε με τα ίδια διαλύματα και τις συγκεντρώσεις όπως στην ίνα της αλουμίνης. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα, με το Σχήμα 3.2.3.8.4 να αφορά τα υδατικά διαλύματα αμμωνίας, το Σχήμα 3.2.3.8.5., αφορά τα μεθανολικά διαλύματα αμμωνίας και το Σχήμα 3.2.3.8.6. έχει τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των δύο καλύτερων αμμωνιακών διαλυμάτων και των διαλυμάτων του TFA. Συμπερασματικά, παρατηρείται ότι η χρήση μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας 1% συνεισφέρει στην εκρόφηση των νουκλεοτιδίων από την ίνα της σταννίας, ενώ η χρήση του διαλύτη TFA 1%, είτε σε υδατικό είτε σε μεθανολικό διάλυμα, δεν ευνοεί την επιθυμητή εκρόφηση.



Σχήμα 3.2.2.8.4. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του υδατικού διαλύματος αμμωνίας στην έκλουση των νουκλεοτιδίων, από ίνα σταννίας.



Σχήμα 3.2.2.8.5. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας στην έκλουση των νουκλεοτιδίων, από ίνα σταννίας.



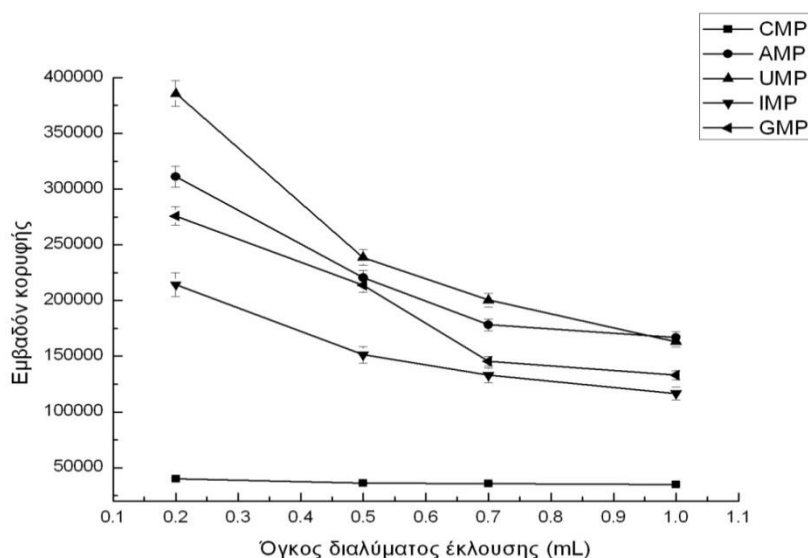
Σχήμα 3.2.2.8.6. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης διαλύματος 1% αμμωνίας (υδατικού διαλύματος και μεθανολικού) και μεθανολικού διαλύματος 1% TFA

Η ίνα σταννίας παρουσιάζει παρόμοια αποτελέσματα με την ίνα αλουμίνας και παρατηρείται μια ενίσχυση της διαδικασίας έκλουσης των νουκλεοτιδίων από τις ίνες αλουμίνας και σταννίας με την παρουσία του οργανικού διαλύτη, οπότε επιλέγεται το μεθανολικό διάλυμα της αμμωνίας 1% για την έκλουση των νουκλεοτιδίων από τις ίνες.

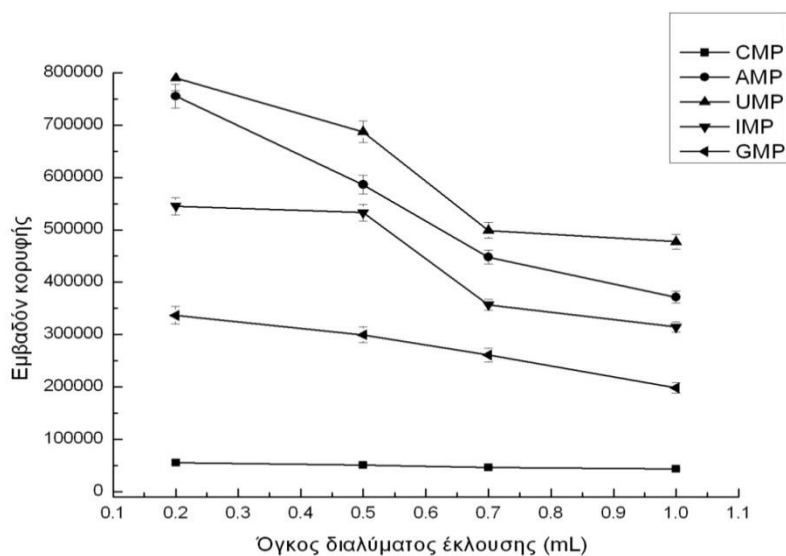
3.2.2.8.2. Επιλογή της ποσότητας του όγκου του διαλύτη έκλουσης

Ακολούθως, μελετήθηκε ο όγκος του μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας 1% που απαιτείται για την έκλουση των νουκλεοτιδίων. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με όγκους 0,2 - 1,0 mL και τα αποτελέσματα παρατίθενται στα Σχήματα 3.2.2.8.7 και 3.2.2.8.8. για τις ίνες της αλουμίνας και της σταννίας αντίστοιχα. Μικρότεροι όγκοι από τα 0,2 mL δεν μελετήθηκαν καθώς δεν ήταν εφικτή η πλήρης εμβάπτιση των ινών.

Ο όγκος του μεθανολικού διαλύματος εμφανίζει την ίδια συμπεριφορά στην έκλουση των νουκλεοτιδίων με τις ίνες αλουμίνας και σταννίας. Συγκεκριμένα, αυξάνοντας τον όγκο του διαλύματος μειώνονται τα εμβαδά των χρωματογραφικών κορυφών των νουκλεοτιδίων, με αποτέλεσμα τα 0,2 mL να εμφανίζουν το βέλτιστο όγκο για την έκλουση των νουκλεοτιδίων από τις ίνες.



Σχήμα 3.2.2.8.7. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του όγκου του μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας 1%, στην έκλουση, με χρήση ίνας αλουμίνας

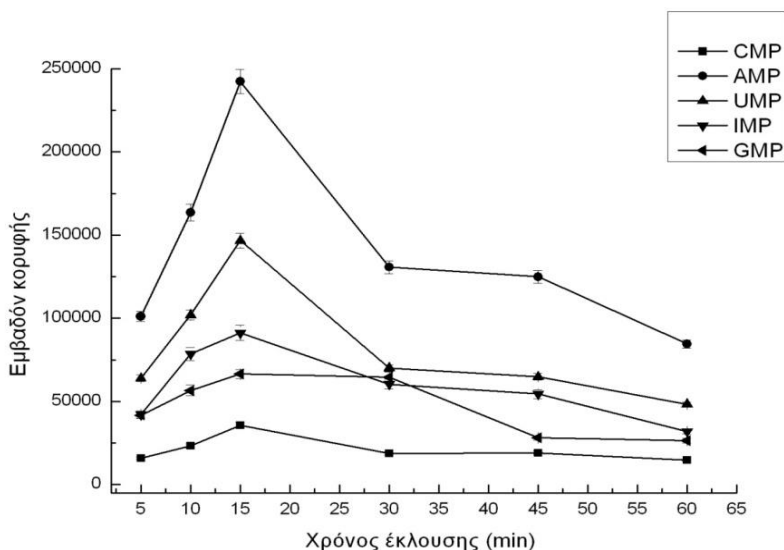


Σχήμα 3.2.2.8.8. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του όγκου του μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας 1%, στην έκλουση, με χρήση ίνας σταννίας

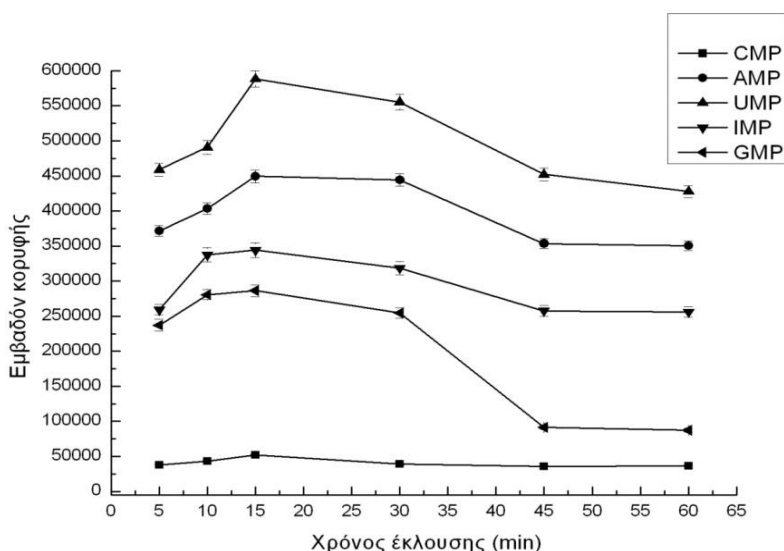
3.2.2.8.3. Επιλογή του χρόνου έκλουσης των νουκλεοτιδίων από τις ίνες με τη χρήση υπερήχων

Μελετήθηκε ο χρόνος που απαιτείται για την έκλουση των νουκλεοτιδίων από τις ίνες αλουμίνας και σταννίας με μεθανολικό διάλυμα αμμωνίας 1%. Η έκλουση πραγματοποιήθηκε τοποθετώντας τα διαλύματα σε λουτρό υπερήχων στους υπό μελέτη χρόνους. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε χρόνους 5, 10, 15, 30, 45 και 60 min και τα αποτελέσματα παρατίθενται στα Σχήματα 3.2.2.8.9. και 3.2.2.8.10.

Οι δύο ίνες εμφανίζουν την ίδια συμπεριφορά και παρατηρείται ότι από τα 5 έως τα 15 min υπάρχει μία αύξηση της έκλυσης των νουκλεοτιδίων από τις ίνες αλουμίνας και σταννίας, ενώ από τα 15 έως τα 60 min εμφανίζεται μείωση των χρωματογραφικών κορυφών. Η μείωση που υφίσταται οφείλεται στην άνοδο της θερμοκρασίας του λουτρού υπερήχων και την αποδόμηση των νουκλεοτιδίων, λόγω υψηλής θερμοκρασίας. Σύμφωνα με τα παραπάνω, ο χρόνος των 15 min είναι αρκετός για την έκλυση των νουκλεοτιδίων από τις ίνες αλουμίνας και σταννίας.



Σχήμα 3.2.2.8.9. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης στην έκλυση του χρόνου του μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας 1%, με ίνα αλουμίνας



Σχήμα 3.2.2.8.10. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης στην έκλυση του χρόνου του μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας 1%, με ίνα σταννίας

3.2.3. ΒΕΛΤΙΣΤΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΙΝΕΣ ΑΛΟΥΜΙΝΑΣ ΚΑΙ ΣΤΑΝΝΙΑΣ–ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΕΡΗΣ ΙΝΑΣ

Η μελέτη της προσυγκέντρωσης και έκλουσης των νουκλεοτιδίων σε ίνες αλουμίνας και σταννίας οδήγησε στις εξής βέλτιστες πειραματικές συνθήκες:

- pH του διαλύματος των νουκλεοτιδίων να είναι 3,0.
- Βέλτιστη θερμοκρασία ανάδευσης του διαλύματος των νουκλεοτιδίων: 40°C
- Ταχύτητα ανάδευσης του διαλύματος των νουκλεοτιδίων: 300 rpm.
- Όγκος του διαλύματος των νουκλεοτιδίων στη προσυγκέντρωση: 2,0 mL.
- Συνθήκες έκλουσης: 0,2 mL μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας 1%, για 15 min σε λουτρό υπερήχων.

Οι κοίλες ίνες αλουμίνας και σταννίας κατασκευάστηκαν επιτυχώς με τη μέθοδο sol-gel και τη χρήση εκμαγείου. Η χρήση και των δύο ινών για την παραλαβή των νουκλεοτιδίων από τα διαλύματα είναι ικανοποιητική, όμως η κοίλη ίνα αλουμίνας κατασκευάζεται ευκολότερα (λιγότεροι παράμετροι χρειάζεται να ληφθούν υπόψη) και είναι ανθεκτικότερη από την ίνα σταννίας σε συνθήκες εργασίας. Επίσης, σύμφωνα με τη μελέτη των παραμέτρων έκλουσης (από τα διαγράμματα μελέτης του pH, της θερμοκρασίας, της ταχύτητας ανάδευσης, κ.α.) παρατηρήθηκε ότι η ίνα αλουμίνας εμφανίζει τα μεγαλύτερα εμβαδά χρωματογραφικών κορυφών και ως εκ τούτου επιτυγχάνει την υψηλότερη προσυγκέντρωση από την ίνα της σταννίας. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε η κοίλη ίνα της αλουμίνας για την προσυγκέντρωση νουκλεοτιδίων από μητρικά γάλατα και βρεφικά εμπορικά γάλατα.

3.2.4. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

3.2.4.1. Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)

Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (LODs και LOQs, αντίστοιχα) στον προσδιορισμό των νουκλεοτιδίων προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD). Για τον υπολογισμό των LODs, ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο πρέπει να είναι ίσος με 3 ($S/N=3$), ενώ για τα LOQs ο ίδιος λόγος πρέπει να είναι ίσος με 10 ($S/N=10$). Τα LODs και τα LOQs για τον κάθε αναλύτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.4.1.

Πίνακας 3.2.4.1. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των αναλυτών

Νουκλεοτιδία	Όριο ανίχνευσης ($\mu\text{g/mL}$) ^a	Όριο ποσοτικοποίησης, LOQ ($\mu\text{g/L}$)
CMP	0,07	0,21
AMP	0,03	0,09
UMP	0,06	0,18
IMP	0,09	0,27
GMP	0,07	0,21

^aLOD: όριο ανίχνευσης. Ορίζεται ως το 1/3 της τιμής του LOQ

3.2.4.2. Γραμμικότητα (Linearity) και ακρίβεια της μεθόδου (Accuracy)

Η γραμμικότητα της εκχύλισης της κοίλης ίνας με καμπύλες βαθμονόμησης μελετήθηκε με ένα εύρος συγκεντρώσεων των νουκλεοτιδίων. Συγκεκριμένα, πρότυπα διαλύματα που περιείχαν τα πέντε υπό μελέτη νουκλεοτιδία σε συγκεντρώσεις από 0,09 έως 50 $\mu\text{g/mL}$, υπέστησαν κατεργασία με την κοίλη ίνα η οποία στη συνέχεια εκλούστηκε και το έκλουσμα εγχύθηκε στο σύστημα HPLC-DAD. Η μέθοδος έδειξε καλές γραμμικότητες με τους συντελεστές προσδιορισμού για τους αναλύτες να κυμαίνονται από 0,9993 έως 0,9997.

Η ακρίβεια εκφράστηκε ως η ανάκτηση (Recovery, R %) ενός αναλύτη, που είναι η εγγύτητα της θεωρητικής με την υπολογιζόμενη συγκέντρωση των αναλυτών με τους οποίους είχε προηγουμένως εμβολιαστεί το δείγμα γάλακτος σκόνης εμπορίου. Τα αποτελέσματα της ανάκτησης για κάθε ένωση μετά από εμβολιασμό σε συγκεντρώσεις διπλάσιες του ορίου ποσοτικοποίησης, παρατίθενται στον Πίνακα 3.2.4.2. Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα αυτού, οι ανακτήσεις των

νουκλεοτιδίων που μελετούνται κυμαίνονται από 84% έως 104% και κρίνονται ιδιαίτερα ικανοποιητικές.

3.2.4.3. Πιστότητα (Precision)

Η πιστότητα εκφράζει τη συμφωνία των τιμών που προέρχονται από ανεξάρτητες επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Μέτρο της πιστότητας αποτελεί η επαναληψιμότητα (intra-day repeatability, RSD_r) και η αναπαραγωγιμότητα (inter-day reproducibility, RSD_{ir}) εκφραζόμενες ως εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, $RSD\%$). Η επαναληψιμότητα υπολογίστηκε με αναλύσεις την ίδια ημέρα, ενός δείγματος βρεφικού γάλακτος του εμπορίου που εμπλουτίστηκε με γνωστές συγκεντρώσεις των υπό μελέτη νουκλεοτιδίων (συγκεντρώσεις εμβολιασμού διπλάσιες από τα όρια ποσοτικοποίησης). Η αναπαραγωγιμότητα υπολογίστηκε με την ανάλυση δείγματος βρεφικού γάλακτος του εμπορίου σε τέσσερις μέρες, ενώ ο έλεγχος πιστότητας της προτεινόμενης μεθοδολογίας και για τις δύο περιπτώσεις έγινε με πέντε επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρατίθενται στον Πίνακα 3.2.4.2.

Πίνακας 3.2.4.2. Εύρος γραμμικότητας, επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα και ανάκτηση μετά από προσυγκέντρωση και έκλουση των πέντε μονονουκλεοτιδίων σε κοίλη ίνα αλουμίνιας.

Νουκλεοτιδια	Εύρος γραμμικότητας ($\mu\text{g/mL}$)	Επαναληψιμότητα (RSD_r) ^a (%)	Αναπαραγωγιμότητα (RSD_{ir}) ^b (%)	Ανάκτηση (%) ^γ
CMP	0,20-50	3,6	4,0	93 (3,4)
AMP	0,09-50	4,2	4,3	91 (3,9)
UMP	0,18-50	3,4	4,1	90 (2,9)
IMP	0,27-50	3,5	4,6	104 (3,9)
GMP	0,22-50	3,6	4,7	84 (3,6)

^a RSD_r : Επαναληψιμότητα, εκφράζεται ως εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση

^b RSD_{ir} : Αναπαραγωγιμότητα, εκφράζεται ως εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση

^γ Τυπικές αποκλίσεις των ανακτήσεων

3.2.4.4. Εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα

Στη συνέχεια, δείγματα γάλακτος σε μορφή σκόνης και μητρικό γάλα χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού των νουκλεοτιδίων. Μελετήθηκαν πέντε βρεφικά γάλατα του εμπορίου και τρία μητρικά. Τα δείγματα γάλακτος υπέστησαν την προκατεργασία ακολουθώντας την πειραματική πορεία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.6.2.1 και στη συνέχεια εμβαπτίστηκε ίνα αλουμίνας για την προσυγκέντρωση σε αυτήν των νουκλεοτιδίων του κάθε δείγματος και ακολουθήθηκε η πειραματική πορεία της παραγράφου 2.6.2.2. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης δίνονται στον Πίνακα 3.2.4.3. Όπως φαίνεται, κάποια δείγματα γάλακτος, κυρίως τα μητρικά δεν περιέχουν όλα τα νουκλεοτίδια. Είναι γνωστό, η διατροφή της μητέρας που θηλάζει επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την ύπαρξη και την ποικιλία των νουκλεοτιδίων που υπάρχουν στο μητρικό γάλα [2].

Στο Σχήμα 3.2.4.1. παρατίθεται χρωματογράφημα από μητρικό γάλα, όπου στα πρώτα 15 min εκλούνται τα υδρόφοβα συστατικά του γάλακτος, τα οποία εκχυλίστηκαν μαζί με τα νουκλεοτίδια, ενώ από τα 20 έως τα 40 min εκλούνται τα πέντε νουκλεοτίδια.

Πίνακας 3.2.4.3. Συγκεντρώσεις των νουκλεοτιδίων που βρίσκονται σε εμπορικά βρεφικά γάλατα και σε μητρικό γάλα, σε $\mu\text{g/mL}$ ($\pm$ τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων)

Γάλα	5'- Μονοφωσφορ ική κυτοσίνη (CMP)	5'- Μονοφωσφορ ική αδενοσίνη (AMP)	5'- Μονοφωσφορ ική ουρακίλη (UMP)	5'- Μονοφωσφορ ική ινοσίνη (IMP)	5'- Μονοφωσφορ ική γουανοσίνη (GMP)
ΓΕ 1	1.7 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.1	3.5 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.1
ΓΕ 2	2.3 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1	2.9 $\pm$ 0.3	5.4 $\pm$ 0.4	12.6 $\pm$ 0.5
ΓΕ 3	0.90 $\pm$ 0.05	3.5 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.3	12.5 $\pm$ 0.5	$\mu\alpha^a$
ΓΕ 4	1.6 $\pm$ 0.1	0.38 $\pm$ 0.04	0.68 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.03	1.0 $\pm$ 0.1
ΓΕ 5	2.9 $\pm$ 0.2	2.7 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.2	2.6 $\pm$ 0.3
ΜΓ 1	2.7 $\pm$ 0.3	0.22 $\pm$ 0.02	1.1 $\pm$ 0.1	$\mu\alpha^a$	$\mu\alpha^a$
ΜΓ 2	4.8 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.1	$\mu\pi^b$	3.7 $\pm$ 0.3	$\mu\pi^b$
ΜΓ 3	2.9 $\pm$ 0.2	2.9 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.2

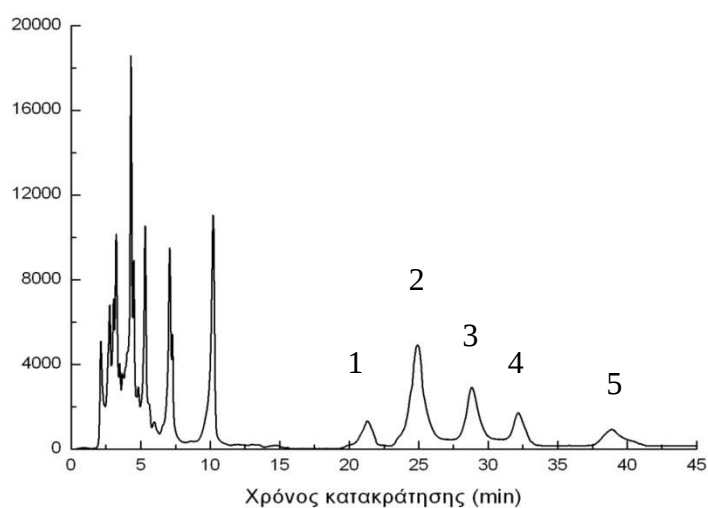
^a $\mu\alpha$: μη ανιχνεύσιμο

^b $\mu\pi$: μη ποσοτικοποιήσιμο

ΓΕ: γάλα του εμπορίου

ΜΓ: μητρικό γάλα

Από τις τιμές των νουκλεοτιδίων στο μητρικό και βρεφικό γάλα του εμπορίου (Πίνακας 3.2.4.2.) παρατηρείται μία διακύμανση στις τιμές συγκεντρώσεων των νουκλεοτιδίων στα δείγματα γάλακτος, από μη ανιχνεύσιμες τιμές έως 12,6 $\mu\text{g/mL}$. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα διεθνή βιβλιογραφικά δεδομένα, με βάση τα οποία μεταξύ δειγμάτων (σε υγρή μορφή ή σκόνη) οι συγκεντρώσεις τους κυμαίνονται από μη ανιχνεύσιμες τιμές έως την τιμή 43,3 $\mu\text{g/mL}$, ανεξαρτήτου προέλευσης (αγελαδινό, σόγιας, κ.α.). [2, 7, 9, 33, 332]



Σχήμα 3.2.4.1. Χρωματογράφημα μητρικού γάλατος. Έως τα 15 min εκλούνται διάφορα υδρόφοβα συστατικά του γάλακτος, ενώ από τα 20 min έως τα 40 min εκλούνται τα υπό μελέτη νουκλεοτίδια. Σειρά έκλουσης: (1) CMP, (2) AMP, (3) UMP, (4) IMP, (5) GMP.

3.3.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ GLYPHOSATE, GLUFOSINATE, BIALAPHOS, (1-AMINOPROPYL)PHOSPHONIC ACID ΚΑΙ (1-AMINOBTYL) PHOSPHONIC ACID ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΟ ΝΕΡΟ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΜΑΖΑΣ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΛΕΚΤΙΚΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΕ ΚΕΡΑΜΙΚΕΣ ΚΟΙΛΕΣ ΙΝΕΣ

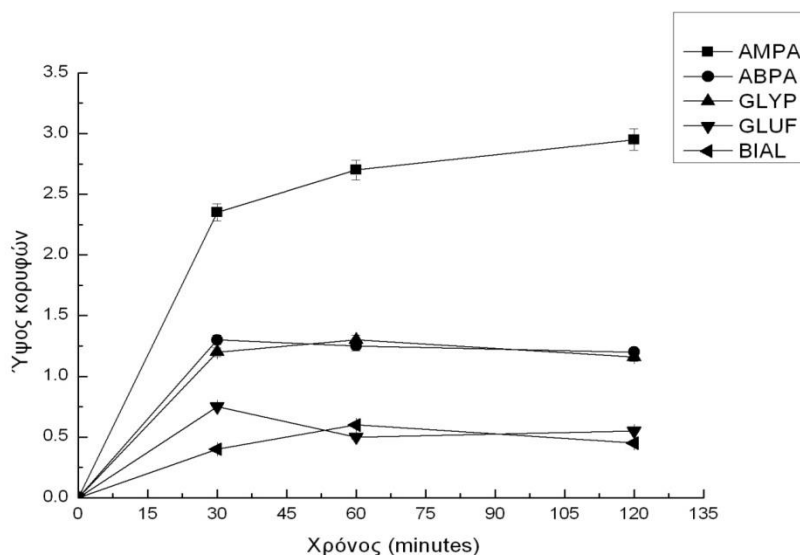
Στο παρόν υποκεφάλαιο πραγματοποιείται μελέτη προσυγκέντρωσης των οργανοφωσφορικών ενώσεων Glyphosate, Glufosinate, Bialaphos, (1-aminopropyl)phosphonic acid και (1-aminobutyl)phosphonic acid, σε κεραμικές ίνες αλουμίνας, τιτανίας, ζirkονίας και σε σύνθετα υλικά αλουμίνας-τιτανίας και τιτανίας-ζirkονίας από πρότυπα διαλύματα φυτοφαρμάκων. Ακολούθως, μελετάται η αεριοχρωματογραφική συμπεριφορά των παραπάνω οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων και εφαρμόζεται η μέθοδος σε επιφανειακό νερό που συλλέγεται από τη λίμνη των Ιωαννίνων. Με τη χρήση των ινών αυτών είναι προσιτή η σύγκριση των υλικών καθώς και των συνδυασμών τους σε σύνθετα υλικά. Επίσης, η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας μετά από προσυγκέντρωση σε κοίλες ίνες και παραγωγοποίηση αποτελεί ιδανική τεχνική για τον διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση των φυτοφαρμάκων αυτών.

3.3.1. Συνθήκες της αντίδρασης παραγωγοποίησης

Η παραγωγοποίηση των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με τον ανυδρίτη του τριφθοροξικού οξέος (TFAA) και την 2,2,2-τριφθοροαιθανόλη (TFE). Η αντίδραση περιγράφεται στην εισαγωγή (§ 1.4.1.). Κατά την αντίδραση παραγωγοποίησης, η ομάδα $\text{CF}_3\text{-CO-}$ αντέδρασε με την αμινο-ομάδα ενώ η ομάδα $\text{-CH}_2\text{CF}_3$ με την υδροξυλο-ομάδα των αναλυτών. Αρχικά, το υδατικό διάλυμα των αναλυτών εξατμίστηκε μέχρι ξηρού καθώς το στάδιο αυτό είναι απαραίτητο, γιατί η παρουσία υγρασίας έχει αναφερθεί ότι μειώνει την απόδοση της αντίδρασης παραγωγοποίησης [340]. Στη συνέχεια προστέθηκαν τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης, και παρότι η αναλογία των ποσοτήτων των αντιδραστηρίων δεν επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της αντίδρασης, η βέλτιστη απόδοση της αντίδρασης παραγωγοποίησης έχει παρατηρηθεί διατηρώντας την αναλογία $\text{TFE} : \text{TFAA} \ 1:2 \ (\text{v/v})$ [341, 342]. Η τοποθέτηση του μίγματος παραγωγοποίησης σε λουτρό υπερήχων για 5-10 min, πριν από την παραγωγοποίηση, επηρέασε την απόκριση, πιθανότατα λόγω της εκρόφησης των φυτοφαρμάκων από τα υάλινα τοιχώματα στο μίγμα της αντίδρασης [344]. Οι

υπέρηχοι επίσης, χρησιμοποιήθηκαν για να βελτιώσουν την ταχύτητα και την απόδοση μιας αντίδρασης καθώς οι υπέρηχοι δημιουργούν μικρές φυσαλίδες σε πολύ μικρούς χρόνους το σπάσιμο των οποίων απελευθεώνει επιπλέον ενέργεια, ένα φαινόμενο γνωστό ως σπηλαίωση [344].

Η αντίδραση παραγωγοποίησης βελτιστοποιήθηκε ως προς τη θερμοκρασία και το χρόνο παραγωγοποίησης. Για τον καθορισμό της θερμοκρασίας της αντίδρασης παραγωγοποίησης των αναλυτών πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε θερμοκρασίες από 60 έως 130 °C. Ως ιδανικότερη κρίθηκε η θερμοκρασία των 95 °C. Οι χαμηλότερες θερμοκρασίες είχαν ως αποτέλεσμα τη μη πλήρη παραγωγοποίηση των αναλυτών, ενώ υψηλότερες θερμοκρασίες δεν επηρέασαν σημαντικά την απόδοση της παραγωγοποίησης. Στο τέλος της αντίδρασης, τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης απομακρύνθηκαν με εξάτμιση γιατί είναι όξινα και κατέστρεφαν σιγά-σιγά τη στατική φάση της χρωματογραφικής στήλης. Διατηρώντας τις παραπάνω συνθήκες σταθερές, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της διάρκειας της αντίδρασης παραγωγοποίησης. Η διάρκεια της αντίδρασης παραγωγοποίησης μελετήθηκε για χρόνους, 30, 60, 120 min, σε θερμοκρασία 95°C. Στο Σχήμα 3.3.1.1. παρατίθενται τα αποτελέσματα του χρόνου παραγωγοποίησης των αναλυτών που μελετήθηκαν. Παρατηρείται αύξηση της απόδοσης της παραγωγοποίησης έως τα 30 min, ενώ από τα 30 έως τα 120 min παρατηρείται μικρή αύξηση για το ABPA, μείωση για το GLUF ενώ τα υπόλοιπα δεν μεταβάλλονται. Συνεπώς, ο χρόνος στον οποίο λαμβάνονται τα καλύτερα αποτελέσματα είναι τα 30 min. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό, με αντίστοιχη μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί με στόχο την παραγωγοποίηση αμινών, αμινοξέων, οργανικών οξέων και σακχάρων [345]. Τα προϊόντα παραγωγοποίησης επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε οργανικό διαλύτη πριν την έγχυση στο χρωματογράφο. Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι καταλληλότερος διαλύτης για την διαδικασία αυτή σε σχέση με το εξάνιο (απολικός) καθώς διαλυτοποιεί πλήρως τους παραγωγοποιημένους αναλύτες, όπως αποδείχθηκε από τις μεγαλύτερες χρωματογραφικές κορυφές που καταγράφονταν. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας περιέχει δεκαπεντάνιο, ως εσωτερικό πρότυπο, για να διορθώνονται τυχόν διακυμάνσεις στον τελικό όγκο των 100 μ L και τον όγκο έγχυσης στον αέριο χρωματογράφο.



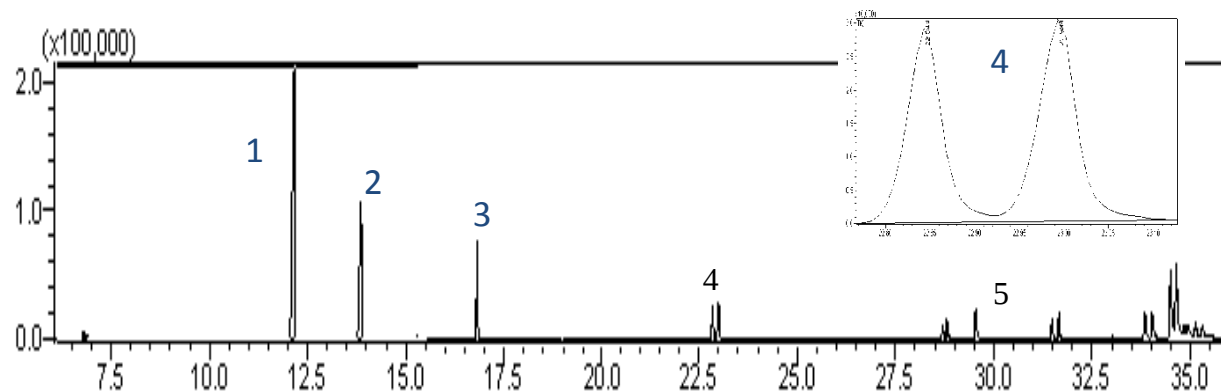
Σχήμα 3.3.1.1. Επίδραση του χρόνου της αντίδρασης παραγωγοποίησης των φυτοφαρμάκων με τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης.

Οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγοποίησης των αναλυτών, όπως προέκυψαν από τα παραπάνω πειράματα, είναι οι εξής:

- Εξάτμιση του πρότυπου υδατικού διαλύματος μέχρι ξηρού
- Προσθήκη 150 μL TFE + 300 μL TFAA
- 10 min σε λουτρό υπερήχων
- 30 min, 95°C
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού
- Προσθήκη 100 μL οξικού αιθυλεστέρα με δεκαπεντάνιο
- Έγχυση 1 μL στο GC-MS

Στο Σχήμα 3.3.1.2. παρατίθεται ένα αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα με τους πέντε αναλύτες ακολουθώντας την παραπάνω πορεία. Οι παραγωγοποιημένοι αναλύτες Glyphosate, (1-aminopropyl)phosphonic acid και (1-aminobutyl)phosphonic acid εμφανίζουν μία κορυφή, το Glufosinate αποτελείται από δύο κορυφές και το Bialaphos από αρκετές κορυφές, που σηματοδοτούν την ύπαρξη περισσότερων ισομερών. Για την ποσοτικοποίηση λήφθηκε υπόψη ο μέσος όρος των δύο ισομερών κορυφών του GLUF (χρόνοι κατακράτησης 22,90 και 23,06 min) και του BIAL (επιλέγονται οι κορυφές που εμφανίζονται σε χρόνους κατακράτησης 31,49 και 31,52

min). Στον Πίνακα 3.3.1. που ακολουθεί (παρατίθενται οι αναλύτες που μελετήθηκαν σύμφωνα με το χρόνο απόκρισής τους και τα χαρακτηριστικά ιόντα τους στον ανιχνευτή μάζας).



Σχήμα 3.3.1.2. Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος φυτοφαρμάκων μετά από παραγωγopoίηση. Η σειρά έκλουσης είναι: (1) (1-aminopropyl)phosphonic acid, (2) (1-aminobutyl)phosphonic acid, (3) Glyphosate, (4) Glufosinate, (5) Bialaphos

Πίνακας 3.3.1. Αναλύτες, χρόνοι απόκρισης και τα χαρακτηριστικά τους ιόντα (m/z).

Ένωση	Χρόνος κατακράτησης (min)	Θραύσμα (M^+)
(1-aminopropyl)phosphonic acid	12,37	69/126/ 154^a /246
(1-aminobutyl)phosphonic acid	14,01	70/126/ 168^a
Glyphosate	16,83	113/238/ 411^a
Δεκαπεντάνιο	18,22	71^a /85
Glufosinate	22,90/23,06	152/ 176^a /200/314
Bialaphos	31,49/31,52	152/176/ 314^a /342/385

^a Βασικά θραύσματα

3.3.2. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΕ ΚΕΡΑΜΙΚΕΣ ΚΟΙΛΕΣ ΙΝΕΣ

Η προσυγκέντρωση των αναλυτών στις κοίλες ίνες των κεραμικών υλικών μελετήθηκε σε υδατικά πρότυπα διαλύματα και όπως προαναφέρθηκε επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν οι ίνες αλουμίνας, τιτανίας, ζirkονίας, και οι σύνθετες ίνες αλουμίνας-τιτανίας και τιτανίας-ζirkονίας. Οι παράμετροι βελτιστοποίησης της προσυγκέντρωσης των αναλυτών στις κεραμικές ίνες ήταν οι εξής:

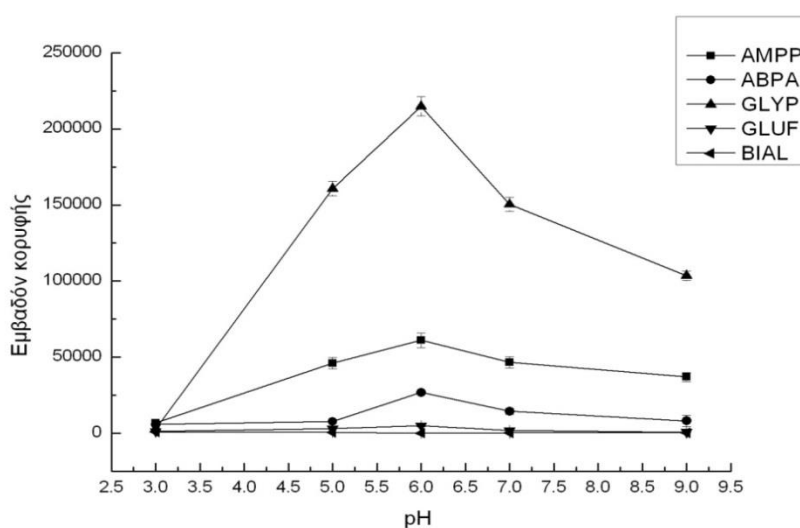
- pH του διαλύματος των φυτοφαρμάκων
- χρόνος ανάδευσης του διαλύματος των φυτοφαρμάκων παρουσία των ινών
- όγκος του διαλύματος των φυτοφαρμάκων για σταθερή ποσότητα αναλυτών
- όγκος του διαλύματος των φυτοφαρμάκων για σταθερή συγκέντρωση αναλυτών

3.3.2.1. pH του διαλύματος των φυτοφαρμάκων

Όπως προαναφέρθηκε (Εισαγωγή §1.8), οι κεραμικές ίνες είναι οξέα κατά Lewis και αντιδρούν με βάσεις κατά Lewis, όπως είναι οι φωσφονικές ομάδες των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων, σχηματίζοντας μονοδοντικούς, διδοντικούς και τριδοντικούς δεσμούς. Το pH του διαλύματος επηρεάζει την ικανότητα των φυτοφαρμάκων να σχηματίζει δεσμούς με τις επιφάνειες των κεραμικών κοίλων ινών. Σε ένα υδατικό διάλυμα, η επιφάνεια των κεραμικών ινών αποτελείται από υδροξυλομάδες. Μεταβάλλοντας το pH του διαλύματος οι υδροξυλομάδες μπορούν να πρωτονιωθούν ή να αποπρωτονιωθούν. Σε χαμηλές τιμές pH η επιφάνεια των ινών πρωτονιώνεται ευκολότερα, δημιουργώντας ισχυρούς δεσμούς με τις φωσφονικές ομάδες των φυτοφαρμάκων. Ωστόσο, σε υψηλές τιμές pH τα φυτοφάρμακα ιοντίζονται και είναι ευκολότερη η προσυγκέντρωσή τους στις επιφάνειες των ινών [346, 347]. Για τη μελέτη της προσυγκέντρωσης των φυτοφαρμάκων στα κεραμικά υλικά σε σχέση με το pH χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα φυτοφαρμάκων σε περιοχή pH 3,0 έως 9,0 με τη χρήση οξικού οξέος και υδροξειδίου του νατρίου. Η επίδραση του pH του διαλύματος στη προσυγκέντρωση των φυτοφαρμάκων στις ίνες αλουμίνας, τιτανίας, ζirkονίας, αλουμίνας-τιτανίας και τιτανίας-ζirkονίας απεικονίζεται στα Σχήματα 3.3.2.1.1-3.3.2.1.5.

Σύμφωνα με το Σχήμα 3.3.2.1.1., στην περιοχή pH 3,0-6,0 η ικανότητα προσρόφησης των αναλυτών αυξάνεται, ενώ στη περιοχή pH 7,0-9,0 μειώνεται. Η

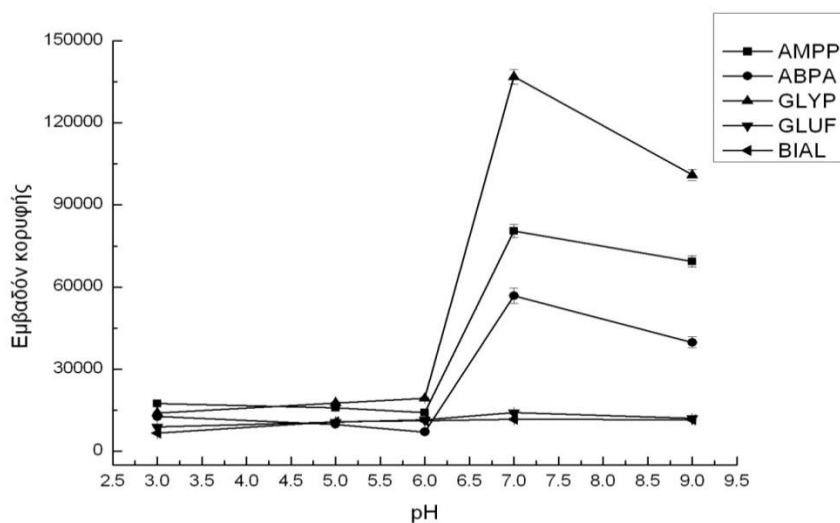
προσρόφηση των αναλυτών εξαρτάται από το σημείο μηδενικού φορτίου (pzc), που για την αλουμίνα είναι 6,2. Όταν το pH του διαλύματος βρίσκεται κάτω από την τιμή αυτή, η επιφάνεια της αλουμίνας φορτίζεται θετικά, ενώ σε pH μεγαλύτερο από το ισοηλεκτρικό σημείο, η αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια της αλουμίνας απωθεί τους αναλύτες, οι οποίοι είναι σε ιοντισμένη μορφή. Για παράδειγμα, για το GLUF ισχύει ότι $pK_{a1} < 2$, $pK_{a2} \approx 2,9$, $pK_{a3} \approx 9,8$ και για το AMPP $pK_{a1} \approx$ πολύ χαμηλό, $pK_{a2} \approx 5,9$, $pK_{a3} \approx 10,4$. Σε pH 6,2 και τα δύο είναι διανιόντα, ενώ το GLYP με τιμές $pK_{a1} \approx 0,8$, $pK_{a2} \approx 2,9$, $pK_{a3} \approx 9,8$, $pK_{a4} \approx 11$ είναι τριανιόν. Για τους αναλύτες BIAL και ABPA δεν υπάρχουν στην βιβλιογραφία τιμές για τις σταθερές διάστασης, όμως επειδή παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά με τους υπόλοιπους αναλύτες που μελετούνται, γίνεται η υπόθεση ότι έχουν και αυτοί παρόμοιες τιμές. Έτσι, η τιμή του pH 6,0 είναι η βέλτιστη για την προσυγκέντρωση των αναλυτών στην επιφάνεια της αλουμίνας.



Σχήμα 3.3.2.1.1. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του pH του διαλύματος των φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση, σε ίνα αλουμίνας

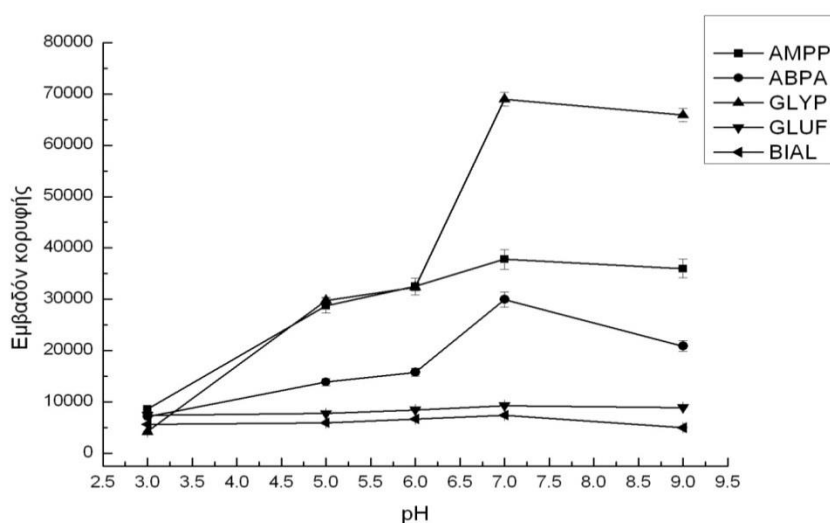
Σύμφωνα με το Σχήμα 3.3.2.1.2., η ικανότητα προσρόφησης των αναλυτών στην ίνα τιτανίας αυξάνεται σε περιοχή pH 3,0-7,0, ενώ στη συνέχεια μειώνεται σε περιοχή pH 7,0-9,0. Η ίνα τιτανίας έχει τιμή σημείου μηδενικού φορτίου $\sim 7,0$, με αποτέλεσμα, για τα φυτοφάρμακα που βρίσκονται στην ιοντισμένη τους μορφή να διευκολύνεται

η προσυγκέντρωσή τους στην ίνα. Έτσι, η βέλτιστη τιμή pH του διαλύματος είναι 7,0.



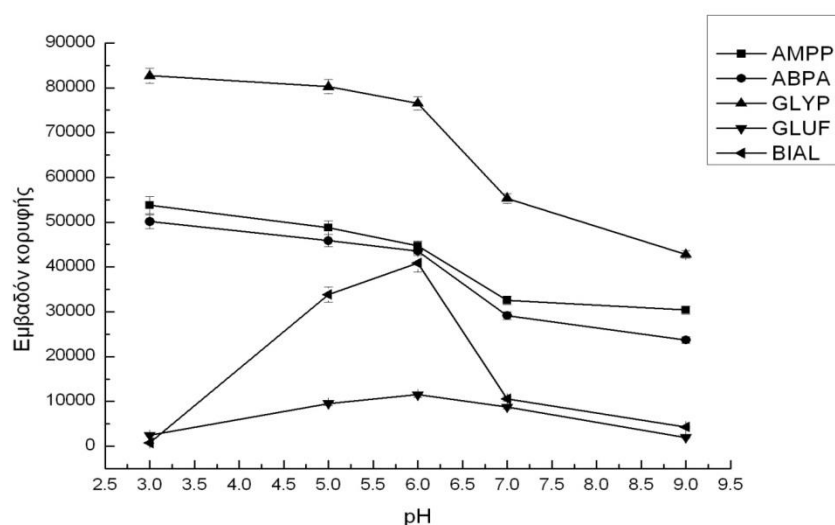
Σχήμα 3.3.2.1.2. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του pH του διαλύματος των φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση, σε ίνα τιτανίας

Σύμφωνα με το Σχήμα 3.3.2.1.3., η ίνα ζirkονίας παρουσιάζει όμοια συμπεριφορά με την ίνα τιτανίας. Έτσι, η ικανότητα προσρόφησης των αναλυτών στην ίνα ζirkονίας αυξάνεται σε περιοχή pH 3,0-7,0, ενώ στη συνέχεια μειώνεται σε περιοχή pH 7,0-9,0. Η ίνα ζirkονίας έχει ZPC~6,8, με αποτέλεσμα, για τα φυτοφάρμακα που βρίσκονται στην ιοντισμένη τους μορφή να διευκολύνεται η προσυγκέντρωσή τους. Έτσι, η βέλτιστη τιμή pH του διαλύματος είναι 7,0.



Σχήμα 3.3.2.1.3. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του pH του διαλύματος των φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση, σε ίνα ζirkονίας

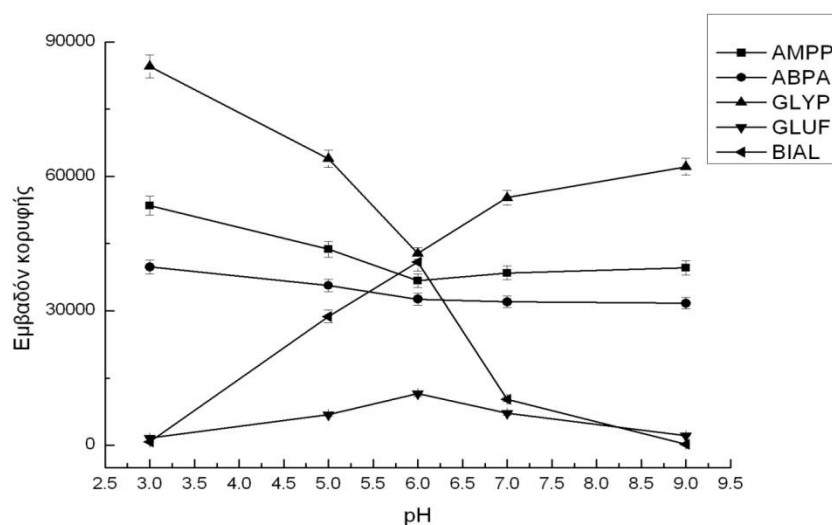
Στη σύνθετη ίνα αλουμίνας-τιτανίας, παρατηρείται για τους αναλύτες AMPP, ABPA και GLYP ένα μέγιστο προσρόφησης σε pH 3,0 με συνεχή μείωση καθώς το pH αυξάνεται μέχρι την τιμή 9,0. Για τους αναλύτες GLUF και BIAL παρατηρείται αύξηση της προσρόφησης τους στην ίνα στην περιοχή pH 3,0-6,0, ενώ στην περιοχή pH 6,0-9,0 παρατηρείται μείωση της προσρόφησης με μέγιστο στην τιμή pH 6,0. Το υλικό αλουμίνα-τιτανία έχει ZPC~5,6 οπότε, σε χαμηλότερες τιμές pH (όπως pH 3,0) η επιφάνεια της ίνας αλουμίνας-τιτανίας εμφανίζει πρωτονιωμένες υδροξυλομάδες και σχηματίζει ισχυρούς δεσμούς με τους αναλύτες AMPP, ABPA και GLYP. Σε pH διαλύματος μεγαλύτερο του 5,6 η ίνα είναι φορτισμένη αρνητικά και διευκολύνει την προσρόφηση των ιοντισμένων αναλυτών GLUF (διπρωτονιωμένο) και BIAL (πιθανότατα διπρωτονιωμένο). Έτσι, η βέλτιστη τιμή pH είναι το 6,0.



Σχήμα 3.3.2.1.4. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του pH του διαλύματος των φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση σε ίνα αλουμίνας-τιτανίας

Στη σύνθετη ίνα τιτανίας-ζirkονίας, παρατηρείται παρόμοια συμπεριφορά με τη σύνθετη ίνα αλουμίνας-τιτανίας. Η ίνα τιτανίας-ζirkονίας έχει σημείο μηδενικού φορτίου ~6,2 και οι αναλύτες AMPP, ABPA και GLYP προσροφούνται στην ίνα σε pH διαλύματος ίσο με 3,0, ενώ οι αναλύτες GLUF και BIAL προσροφούνται στην ίνα

σε τιμές pH μεγαλύτερες του σημείου μηδενικού φορτίου, δηλαδή σε pH 6,0, με την τιμή αυτή να θεωρείται η βέλτιστη για την ίνα τιτανίας-ζirkονίας.



Σχήμα 3.3.2.1.5. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του pH του διαλύματος των φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση, σε ίνα τιτανίας-ζirkονίας

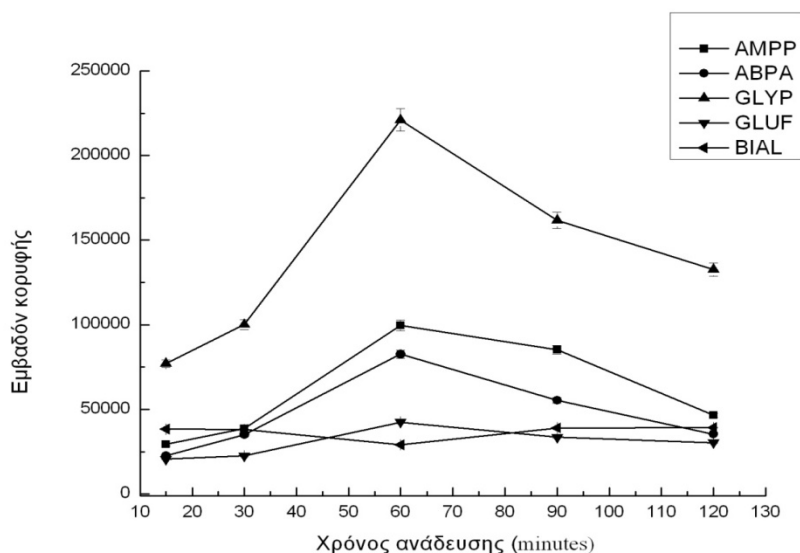
Παρατηρώντας τα γραφήματα, διαπιστώνεται ότι στις ίνες αλουμίνας, τιτανίας και ζirkονίας η επιλογή του βέλτιστου pH είναι εμφανής. Πρόκειται για τις τιμές pH 6,0 για την αλουμίνα και 7,0 για τις τιτανία και ζirkονία. Για τις σύνθετες ίνες, που παρατηρείται η ίδια συμπεριφορά στην προσρόφηση των αναλυτών, καθίσταται δύσκολη η επιλογή μιας και μόνο τιμής pH που να ικανοποιεί όλους τους αναλύτες. Όμως θα μπορούσε να επιλεγεί το pH 6,0 και για τα δύο σύνθετα υλικά διότι οι αναλύτες στην τιμή αυτή προσυγκεντρώνονται αρκετά ικανοποιητικά.

Συμπερασματικά, τα κεραμικά υλικά που μελετώνται περιέχουν υδροξυλομάδες στις επιφάνειές τους και σχηματίζουν δεσμούς με τους αναλύτες. Μάλιστα, είναι εμφανές ότι το pH επηρεάζει τις υδροξυλομάδες που πρωτονιώνονται ή αποπρωτονιώνονται και στο Σχήμα 3.3.2.1.5. είναι εμφανής η επίδραση αυτή. Συγκεκριμένα, παρατηρείται υψηλή προσυγκέντρωση των αναλυτών στην ίνα σε χαμηλό pH, επειδή σχηματίζονται ισχυροί δεσμοί μεταξύ ινών και αναλυτών, λόγω πρωτονίωσης της επιφάνειας των ινών. Επίσης, στο Σχήμα 3.3.2.1.5. παρατηρείται υψηλή προσυγκέντρωση των αναλυτών στην ίνα τιτανία-ζirkονία σε υψηλό pH, όπου ιονίζονται οι αναλύτες και προσυγκεντρώνονται ευκολότερα στην επιφάνεια των ινών.

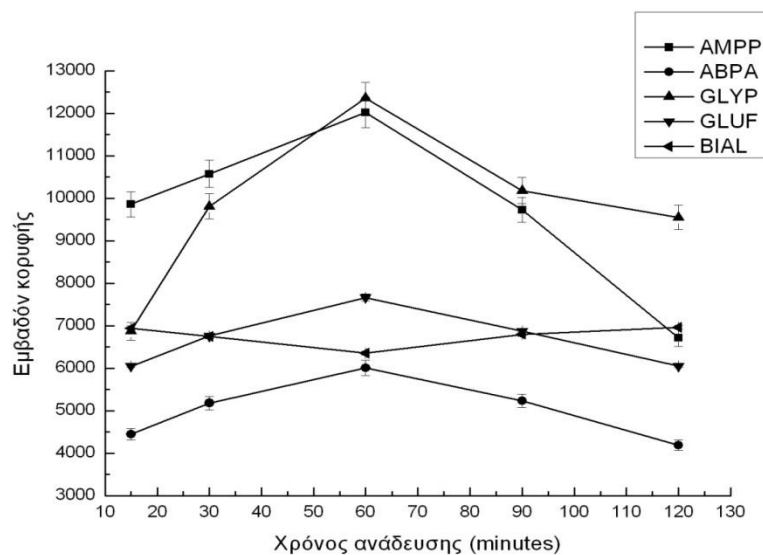
3.3.2.2. Χρόνος ανάδευσης του διαλύματος των φυτοφαρμάκων

Μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου ανάδευσης του διαλύματος των φυτοφαρμάκων παρουσία των ινών, για χρόνους 15, 30, 60, 90 και 120 min. Η ποσότητα των φυτοφαρμάκων που προσροφάται σε κάθε ίνα εξαρτάται από τη συγγένεια του εκάστοτε υλικού με τους αναλύτες. Η διαδικασία της προσρόφησης και εκρόφησης πραγματοποιείται εφόσον οι αναλύτες έχουν την ικανότητα να προσυγκεντρώνονται στις κεραμικές ίνες. Στα Σχήματα 3.3.2.2.1-3.3.2.2.5 δίνεται γραφικά η επίδραση του χρόνου ανάδευσης στην προσυγκέντρωση διαλυμάτων φυτοφαρμάκων με ίνες, αλουμίνας, τιτανίας, ζirkονίας, αλουμίνα-τιτανίας και τιτανίας-ζirkονίας.

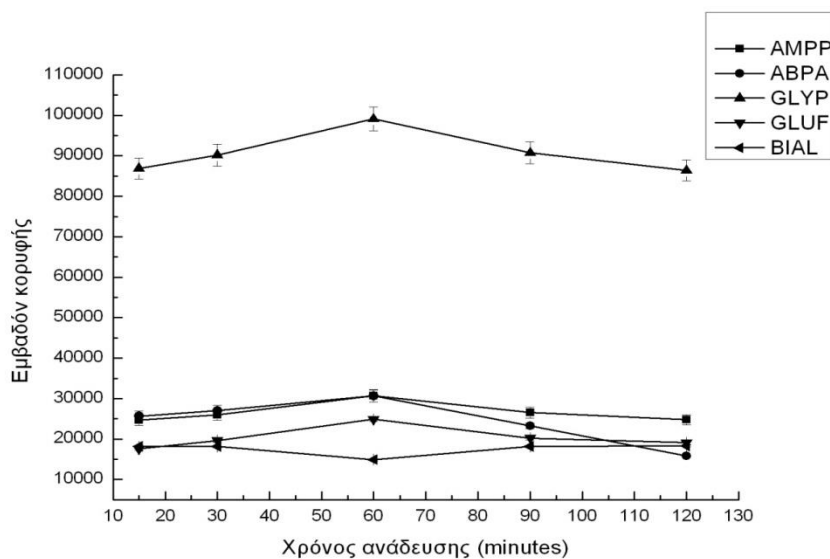
Παρατηρείται ότι όλες οι ίνες εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά. Οι αναλύτες GLYP, GLUF, AMPP και ABPA προσυγκεντρώνονται στις ίνες έως τα 60 min, ενώ στη συνέχεια παρατηρείται μείωση της προσρόφησης έως τα 120 min. Είναι πιθανόν, ότι καθώς η ανάδευση συνεχίζεται, μετά την αρχική προσρόφηση των αναλυτών στις ίνες η παρατεταμένη ανάδευση ευνοεί την εκρόφηση των αναλυτών και συνεπώς, η απόδοση προσυγκέντρωσης μειώνεται. Σε αντίθεση, το BIAL προσροφάται έως τα 15 min, στη συνέχεια μειώνεται η προσρόφησης του στην ίνα έως τα 60 min, για να προσροφηθεί πάλι στα 120 min. Συμπερασματικά, ο χρόνος ανάδευσης των 60 min κρίνεται κατάλληλος για την βέλτιστη προσυγκέντρωση των αναλυτών στις ίνες.



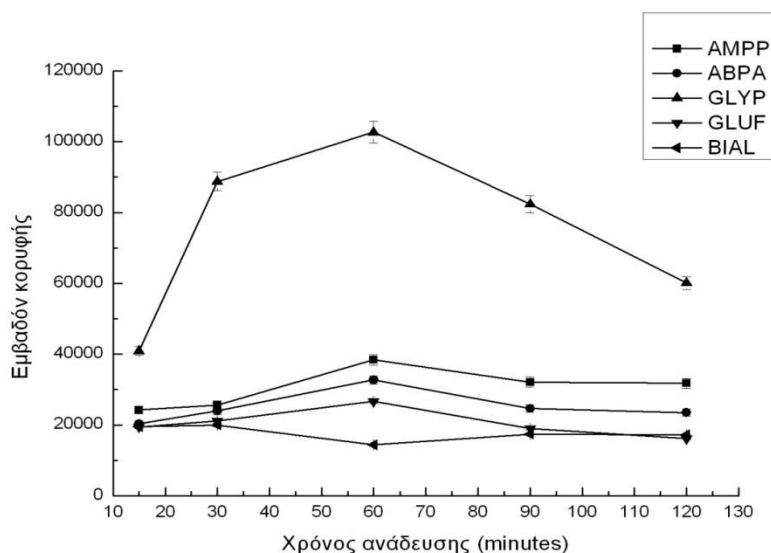
Σχήμα 3.3.2.2.1. Γραφική απεικόνιση του χρόνου ανάδευσης του διαλύματος των φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση σε ίνα αλουμίνας



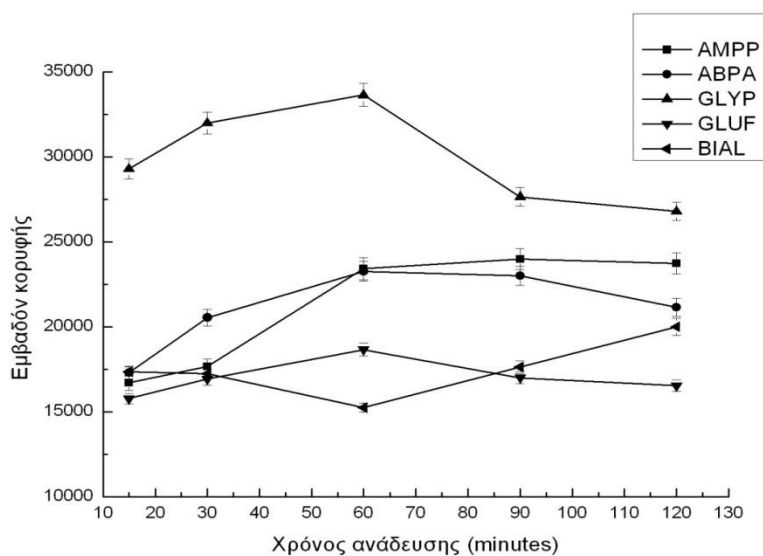
Σχήμα 3.3.2.2.2. Γραφική απεικόνιση του χρόνου ανάδευσης του διαλύματος των φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση, σε 1N τιτανίας.



Σχήμα 3.3.2.2.3. Γραφική απεικόνιση του χρόνου ανάδευσης του διαλύματος των φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση, σε 1N ζirkονίας.



Σχήμα 3.3.2.2.4. Γραφική απεικόνιση του χρόνου ανάδευσης του διαλύματος των φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση σε ίνα αλουμίνας-τιτανίας.



Σχήμα 3.3.2.2.5. Γραφική απεικόνιση του χρόνου ανάδευσης του διαλύματος των φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση σε ίνα τιτανία-ζirkονία.

3.3.2.3. Όγκος του διαλύματος των φυτοφαρμάκων για σταθερή ποσότητα αναλυτών

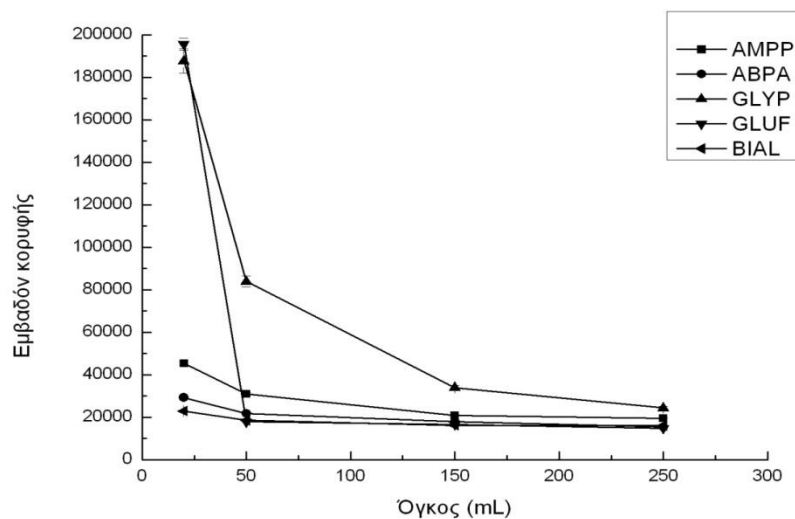
Ακολούθως, μελετήθηκε η επίδραση του όγκου του διαλύματος των φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση, σε κοίλες ίνες αλουμίνας, τιτανίας, ζirkονίας, αλουμίνας-τιτανίας και τιτανίας-ζirkονίας. Αρχικά, η προσυγκέντρωση

πραγματοποιήθηκε σε διαλύματα όγκου 20, 50, 150 και 250 mL, τα οποία περιείχαν την ίδια ποσότητα φυτοφαρμάκων και μία κοίλη ίνα από κάθε κεραμικό υλικό. Οι ποσότητες κάθε αναλύτη στα διαλύματα φαίνονται στον Πίνακα 3.3.2.3.1. ενώ στα Σχήματα 3.3.2.3.1-3.3.2.3.5. απεικονίζεται η επίδραση του όγκου διαλύματος αναλυτών στην προσυγκέντρωση σε ίνες, για σταθερή ποσότητα αναλυτών στο διάλυμα.

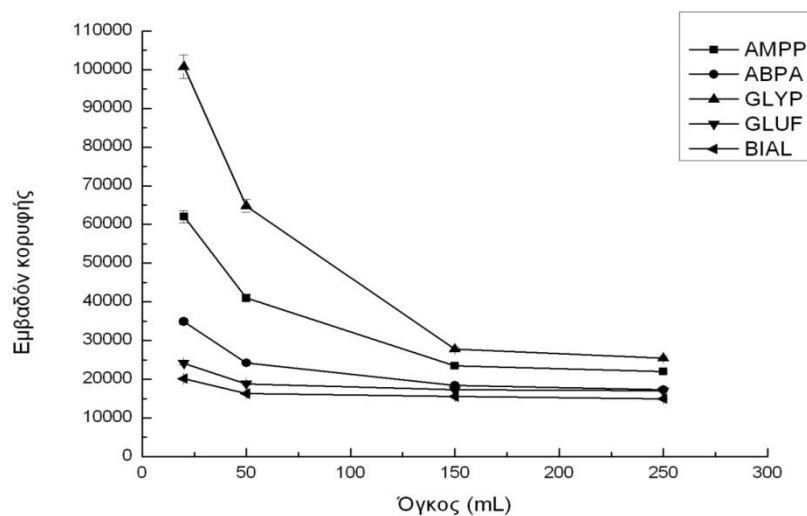
Συμπερασματικά, η προσυγκέντρωση σε όλες τις ίνες μειώνεται, αυξάνοντας το όγκο του διαλύματος των φυτοφαρμάκων. Αυτό είναι αναμενόμενο, αφού με αύξηση του όγκου επέρχεται μείωση της συγκέντρωσης των αναλυτών, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη προσρόφηση ποσότητας αναλυτών πάνω σε κάθε ίνα. Επιπλέον, η ταυτόχρονη μείωση της συγκέντρωσης των αναλυτών με αύξηση του όγκου του διαλύματος ακόμη και στην περίπτωση που οδηγεί σε μικρή μείωση της προσυγκέντρωσης αρχικά, η μείωση αυτή συνοδεύεται από μεγαλύτερη καθώς αυξάνεται ο όγκος λόγω πιθανόν και τη δυσκολίας της ίνας να προσυγκεντρώνει όταν ο όγκος του διαλύματος καθίσταται υπερβολικά μεγάλος.

Πίνακας 3.3.2.3.1. Οι αναλύτες και οι συγκεντρώσεις τους σε κάθε διάλυμα. Η ποσότητες των αναλυτών στα διαλύματα είναι σταθερή.

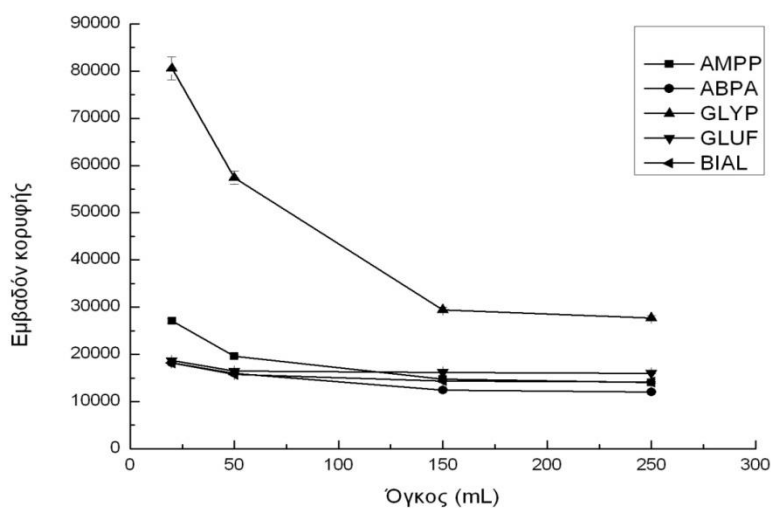
Αναλύτες	Συγκεντρώσεις αναλυτών σε κάθε διάλυμα (μg/L)			
	20 mL	50 mL	150 mL	250 mL
AMPP	1,5	0,3	0,15	0,1
ABPA	1,5	0,3	0,15	0,1
GLYP	1,5	0,3	0,15	0,1
GLUF	7,5	1,5	0,75	0,5
BIAL	60	12	6	4



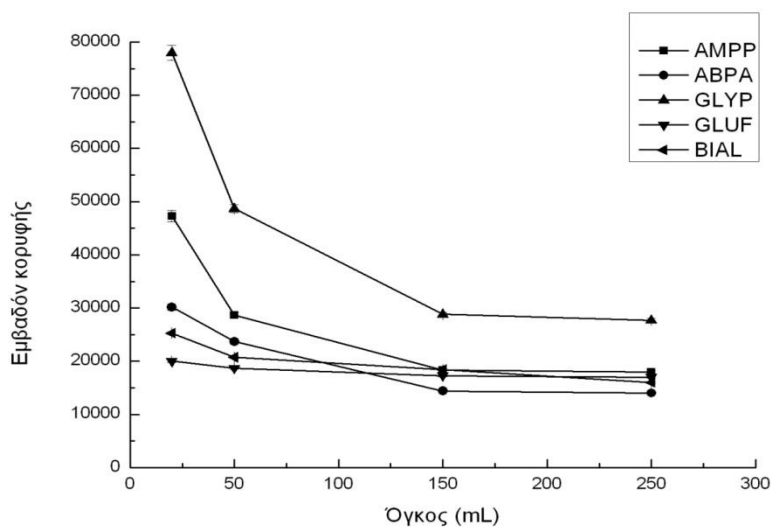
Σχήμα 3.3.2.3.1. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του όγκου διαλύματος φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση σε ίνα αλουμίνας, για σταθερή ποσότητα αναλυτών στο διάλυμα.



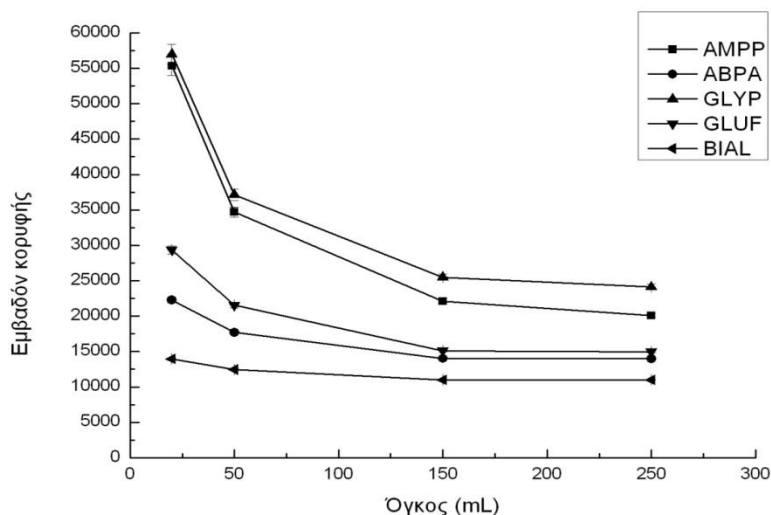
Σχήμα 3.3.2.3.2. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του όγκου διαλύματος φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση σε ίνα τιτανίας, για σταθερή ποσότητα αναλυτών στο διάλυμα.



Σχήμα 3.3.2.3.3. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του όγκου διαλύματος φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση σε ίνα ζιρκονίας, για σταθερή ποσότητα αναλυτών στο διάλυμα.



Σχήμα 3.3.2.3.4. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του όγκου διαλύματος φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση σε ίνα αλουμίνας-τιτανίας, για σταθερή ποσότητα αναλυτών

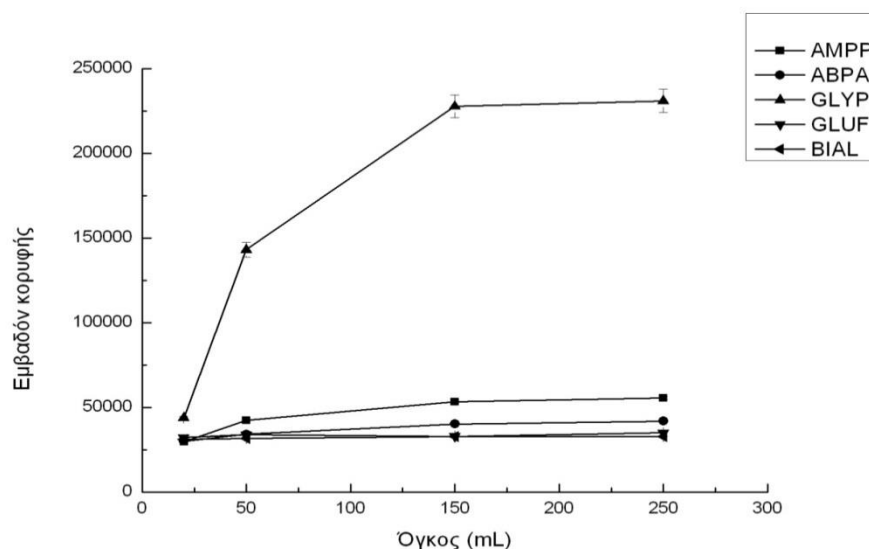


Σχήμα 3.3.2.3.5. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του όγκου διαλύματος φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση σε ίνα τιτανίας-ζirkονίας, για σταθερή ποσότητα αναλυτών

3.3.2.4. Όγκος του διαλύματος των φυτοφαρμάκων για σταθερή συγκέντρωση αναλυτών

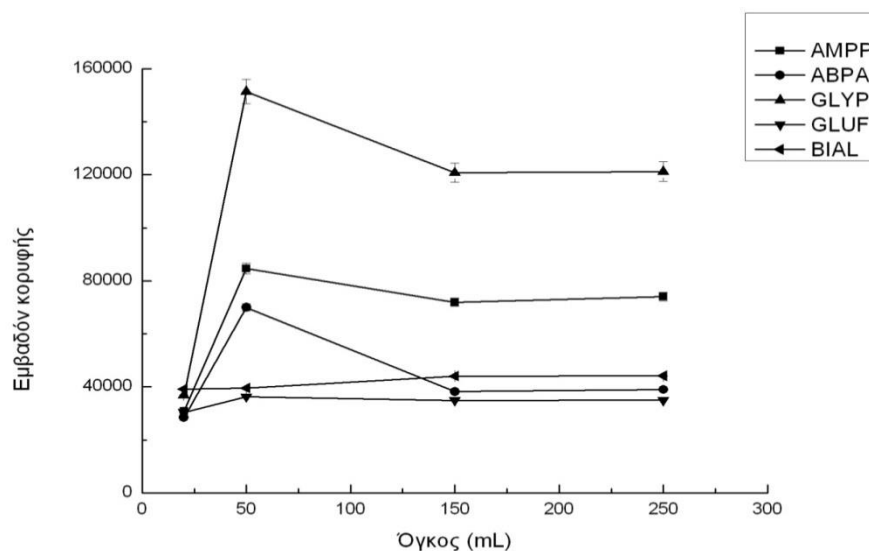
Προκειμένου να επιτευχθεί η μεγαλύτερη δυνατή προσυγκέντρωση στις ίνες είναι απαραίτητο να μελετηθεί η επίδραση του όγκου του διαλύματος των φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωσή τους, σε διαφορετικά διαλύματα που περιέχουν ίνες αλουμίνας, τιτανίας, ζirkονίας, αλουμίνας-τιτανίας και τιτανίας-ζirkονίας. Συγκεκριμένα, η προσυγκέντρωση πραγματοποιήθηκε σε διαλύματα με όγκους 20, 50, 150 και 250 mL, τα οποία περιείχαν την ίδια συγκέντρωση φυτοφαρμάκων. Οι συγκεντρώσεις για κάθε αναλύτη ήταν: 10 µg/L για το AMPP, 10 µg/L για το ABPA, 10 µg/L για το GLYP, 10 µg/L για το GLUF και 40 µg/L για το BIAL. Στα Σχήματα 3.3.2.4.1.-3.3.2.4.5 δίνεται η επίδραση του όγκου του διαλύματος στην προσυγκέντρωση κάθε ίνας.

Παρατηρείται ότι αυξάνοντας τον όγκο του διαλύματος των αναλυτών από τα 20 έως τα 150 mL αυξάνεται και η προσρόφηση των αναλυτών στην ίνα αλουμίνας. Μετά τα 150 mL δεν παρατηρείται περαιτέρω προσρόφηση στην επιφάνεια της ίνας.



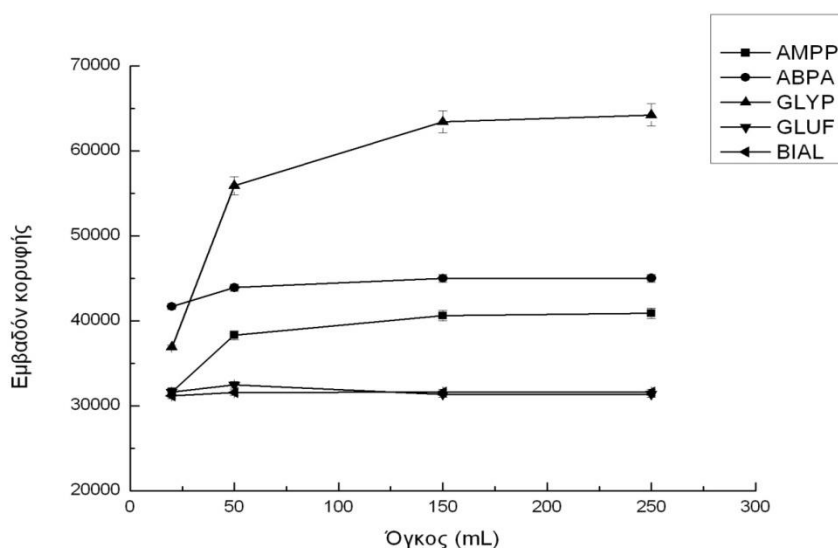
Σχήμα 3.3.2.4.1. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του όγκου διαλύματος φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση σε ίνα αλουμίνιας, για σταθερή συγκέντρωση αναλυτών

Στην ίνα τιτανίας παρατηρείται ότι τα φυτοφάρμακα GLYP, AMPP, ABPA και GLUF εμφανίζουν αύξηση της προσρόφησης σε διάλυμα όγκου από 20 έως 50 mL, όμως αυξάνοντας τον όγκο του διαλύματος έως τα 250 mL είναι εμφανής η μείωση της προσρόφησης των αναλυτών στην ίνα. Σε αντίθεση με τους υπόλοιπους αναλύτες, το BIAL συνεχίζει να προσροφάται στην ίνα τιτανίας.



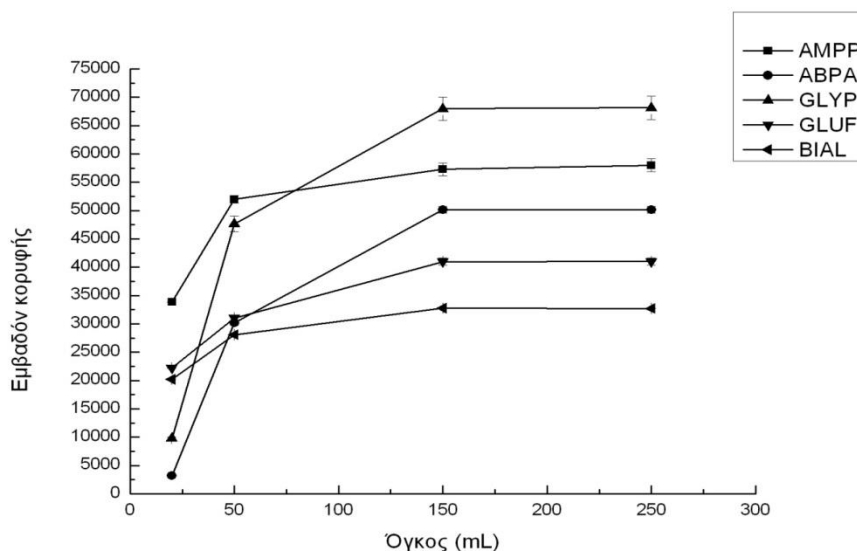
Σχήμα 3.3.2.4.2. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του όγκου διαλύματος φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση σε ίνα τιτανίας, για σταθερή συγκέντρωση αναλυτών

Στην ίνα της ζιρκονίας παρατηρείται αύξηση της προσρόφησης των φυτοφαρμάκων καθώς αυξάνεται ο όγκος του διαλύματος έως τα 150 mL και φτάνει σε ισορροπία. Από τη γενική τάση των φυτοφαρμάκων, εξαιρείται το GLUF, του οποίου η προσρόφηση στην ίνα αυξάνεται μέχρι τα 150 mL και στη συνέχεια μειώνεται ελαφρώς, έως τον όγκο των 250 mL.



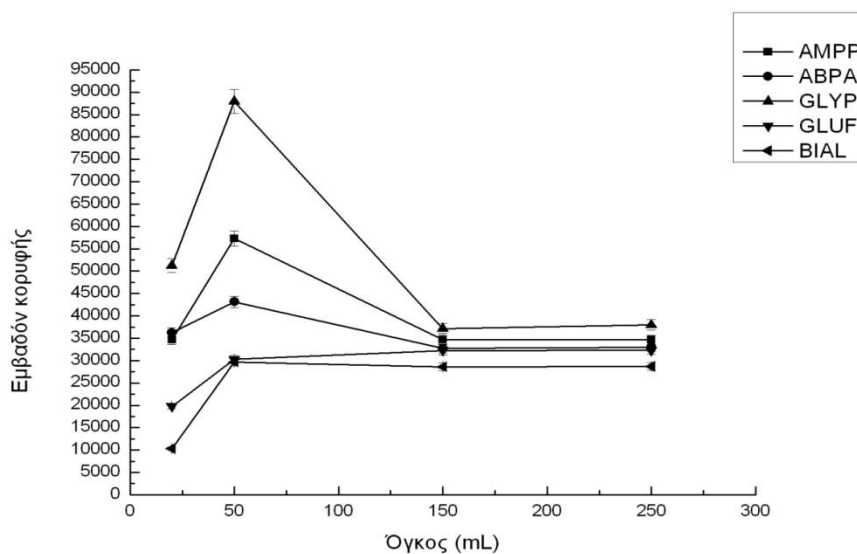
Σχήμα 3.3.2.4.3. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του όγκου διαλύματος φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση σε ίνα ζιρκονίας, για σταθερή συγκέντρωση αναλυτών

Η σύνθετη ίνα αλουμίνας-τιτανίας παρουσιάζει όμοια συμπεριφορά με την ίνα αλουμίνας, στην οποία παρατηρείται αύξηση της προσυγκέντρωσης όλων των φυτοφαρμάκων με αύξηση του όγκου του διαλύματος έως τα 150 mL όπου φαίνεται να επέρχεται ισορροπία.



Σχήμα 3.3.2.4.4. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του όγκου διαλύματος φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση σε ίνα αλουμίνιας-τιτανίας, για σταθερή συγκέντρωση αναλυτών

Η σύνθετη ίνα τιτανίας-ζirkονίας παρουσιάζει όμοια συμπεριφορά με την ίνα τιτανίας, δηλαδή, αυξάνεται η ποσότητα των φυτοφαρμάκων που προσυγκεντρώνονται στην ίνα με την αύξηση του όγκου διαλύματος έως τα 50 mL στη συνέχεια μειώνεται σημαντικά.



Σχήμα 3.3.2.4.5. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του όγκου διαλύματος φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση σε ίνα τιτανίας-ζirkονίας, για σταθερή συγκέντρωση αναλυτών

Σύμφωνα με τα παραπάνω γραφήματα, οι κοίλες ίνες αλουμίνας, ζirkονίας και αλουμίνας-τιτανίας παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά στην προσυγκέντρωση των αναλυτών, δηλ. αύξηση της προσυγκέντρωσης των αναλυτών στις ίνες με την αύξηση του όγκου των διαλύμάτων μέχρι κάποιο όγκο. Η ίνα τιτανίας παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά η με τη σύνθετη τιτανία-ζirkονία, δηλ αύξηση της προσρόφησης των αναλυτών μέχρι ένα μέγιστο και στη συνέχεια μείωση της προσρόφησης. Επίσης, η διαφορετική συμπεριφορά των ινών αλουμίνας, ζirkονίας, αλουμίνας-τιτανίας σε σχέση με τις ίνες τιτανίας και τιτανίας-ζirkονίας οφείλεται πιθανότατα στην διαφορετική συγγένεια που έχουν τα υλικά με τους αναλύτες. Έτσι, οι ίνες τιτανίας και τιτανίας-ζirkονίας έχουν πιθανότατα μικρότερη συγγένεια με τους αναλύτες κυρίως λόγω της παρουσίας της τιτανίας. Οι αναλύτες προσροφούνται στις συγκεκριμένες ίνες μέχρι ένα συγκεκριμένο όγκο διαλύματος. Περαιτέρω αύξηση του όγκου μειώνει την ικανότητα των αναλυτών να προσροφούνται στις ίνες λόγω της επαναφοράς των αναλυτών στην υδατική φάση ή στην αδυναμία των υλικών των ινών να προσυγκεντρώσουν τους αναλύτες . Αντίθετα, οι ίνες αλουμίνας, ζirkονίας, αλουμίνας-τιτανίας, που πιθανότατα έχουν ισχυρότερη συγγένεια με τους αναλύτες, αφού αυξάνεται η προσυγκέντρωση των ινών με αύξηση του όγκου. Έχοντας υπόψη ότι η αναλυτική διαδικασία μπορεί να έχει εφαρμογή σε δείγματα με μικρό όγκο, τα 50 mL είναι ικανοποιητικά για τις περαιτέρω αναλύσεις.

3.3.3. ΒΕΛΤΙΣΤΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΑΝΑΛΥΤΩΝ ΣΕ ΙΝΕΣ ΑΛΟΥΜΙΝΑΣ, ΤΙΤΑΝΙΑΣ, ΖΙΡΚΟΝΙΑΣ, ΑΛΟΥΜΙΝΑΣ-ΤΙΤΑΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΙΤΑΝΙΑΣ-ΖΙΡΚΟΝΙΑΣ - ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΕΡΗΣ ΙΝΑΣ

Η βελτιστοποίηση στην προσυγκέντρωση των φυτοφαρμάκων που μελετήθηκαν σε ίνες αλουμίνας, τιτανίας, ζirkονίας, αλουμίνα-τιτανίας και τιτανίας-ζirkονίας οδήγησε στις εξής πειραματικές συνθήκες:

- pH του διαλύματος των φυτοφαρμάκων: 6,0 για την αλουμίνα, 7,0 για την τιτανία και τη ζirkονία, 6,0 για την αλουμίνα-τιτανία και την τιτανία-ζirkονία
- Χρόνος ανάδευσης του διαλύματος των φυτοφαρμάκων: 60 min.
- Όγκος του διαλύματος των φυτοφαρμάκων στην προσυγκέντρωση: 50,0 mL.

Οι πέντε κοίλες ίνες που κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο sol-gel χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς για την προσυγκέντρωση των φυτοφαρμάκων από πρότυπα διαλύματα. Από τις ίνες αυτές, η ίνα αλουμίνας χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω ανάλυση των φυτοφαρμάκων σε πραγματικά δείγματα διότι από τα γραφήματα παρατηρείται ότι επιτυγχάνονται τα μεγαλύτερα εμβαδά κορυφών, και συνεπώς εμφανίζεται να επιτυγχάνει την υψηλότερη προσυγκέντρωση.

3.3.4. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

3.3.4.1. Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)

Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (LODs και LOQs, αντίστοιχα) στον προσδιορισμό των οργανοφωσφορικών αναλυτών προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή μάζας με πρόγραμμα επιλεγμένων ιόντων (Selective Ion Monitoring, SIM). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα ιόντα 69, 70, 113, 126, 152, 154, 162, 168, 176, 189, 200, 238, 244, 246, 314, 342, 385, 411. Για τον υπολογισμό των LODs και LOQs υπολογίστηκαν οι λόγοι σήματος προς το θόρυβο (S/N)=3 και (S/N)=10 αντίστοιχα. Τα LODs και τα LOQs για τον κάθε αναλύτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.5.1. Παρατηρείται ότι το AMPP εμφανίζει το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης, ενώ το BIAL έχει το υψηλότερο όριο ανίχνευσης μεταξύ των αναλυτών. Η μεγάλη αυτή διαφορά του BIAL σε σχέση με τους υπόλοιπους αναλύτες οφείλεται πιθανότατα στη δυσκολία παραγωγοποίησης του μορίου του, λόγω του μεγάλου όγκου του.

Πίνακας 3.3.5.1. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των αναλυτών

Αναλύτης	Όριο ανίχνευσης, LOD ^a (µg/L)	Όριο ποσοτικοποίησης, LOQ (µg/L)
AMPP	0,018	0,05
ABPA	0,05	0,15
GLYP	0,07	0,21
GLUF	0,17	0,51
BIAL	3,5	10,5

^aLOD: όριο ανίχνευσης. Ορίζεται ως το 1/3 της τιμής του LOQ.

3.3.4.2. Ακρίβεια (Accuracy) και Πιστότητα (Precision)

Η ακρίβεια της μεθόδου μελετήθηκε με την ανάλυση νερού της λίμνης Παμβώτιδας που εμβολιάστηκε με τα πέντε πρότυπα διαλύματα φυτοφαρμάκων. Ο έλεγχος πιστότητας πραγματοποιήθηκε με τρεις επαναλήψεις την ίδια μέρα, σε δύο επίπεδα εμβολιασμού: το πρώτο επίπεδο περιλαμβάνει τον εμβολιασμό συγκεντρώσεων διπλάσιας συγκέντρωσης των ορίων ποσοτικοποίησης και το δεύτερο επίπεδο δεκαπλάσιες συγκεντρώσεις των ορίων ποσοτικοποίησης. Στη συνέχεια η

ίνα αλουμίνας αναλύθηκε σύμφωνα με την προτεινόμενη μέθοδο, ακολουθώντας την πειραματική πορεία που περιγράφεται παραπάνω (§ 2.6.3.) και η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στην αέρια χρωματογραφία (GC) χρησιμοποιώντας τις συνθήκες που προέκυψαν από την βελτιστοποίηση.

Στον Πίνακα 3.3.5.2.1. παρατίθενται οι ανακτήσεις και η επαναληψιμότητα των φυτοφαρμάκων και των μεταβολιτών τους. Οι ανακτήσεις είναι ικανοποιητικές για όλους τους αναλύτες.

Πίνακας 3.3.5.2.1. Τιμές ανακτήσεων (%) έπειτα από την εφαρμογή της προτεινόμενης μεθόδου σε δείγματα νερού λίμνης εμβολιασμένα σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις

Αναλύτης	Επίπεδο εμβολιασμού ($\mu\text{g/L}^{-1}$) ^a	Ανάκτηση (%) ^β	Επαναλη ψιμότητα (RSDr) (%) ^γ	Επίπεδο εμβολιασμού ($\mu\text{g/L}^{-1}$) ^a	Ανάκτηση (%) ^β	Επαναλη ψιμότητα (RSDr) (%) ^γ
AMPP	0,035	102	3,8	0,35	100	4,9
ABPA	0,1	96	4,2	1	101	5,1
GLYP	0,15	103	4,4	1,5	95	5,7
GLUF	0,3	103	3,6	3	106	4,4
BIAL	7,0	89	3,2	70	92	4,2

^a Το σήμα (S) του ανιχνευτή είναι τριπλάσιο του θορύβου (N) ($S/N = 3$)

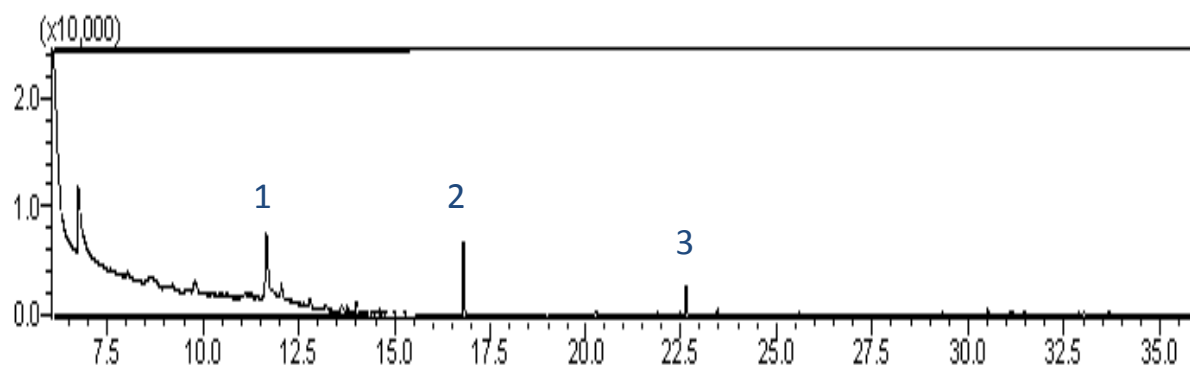
^β Η ανάκτηση της προτεινόμενης μεθόδου πραγματοποιήθηκε με εμβολιασμό δείγματος τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων

^γ RSDr: Επαναληψιμότητα, εκφράζεται ως εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση

3.3.4.3. Εφαρμογή σε πραγματικό δείγμα

Η ίνα αλουμίνας χρησιμοποιήθηκε μέχρι τώρα με επιτυχία σε υδατικά διαλύματα αναλυτών. Ακολούθως, μελετήθηκε η εφαρμογή της μεθόδου σε ένα επιφανειακό υδατικό δείγμα, όπως είναι το νερό λίμνης. Συγκεκριμένα, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγμα νερού της λίμνης Παμβώτιδας για τον προσδιορισμό των συγκεκριμένων φυτοφαρμάκων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το δείγμα νερού που εξετάστηκε, περιείχε τρία από τα πέντε υπό μελέτη φυτοφάρμακα (Σχήμα 3.3.5.3.1.). Οι συγκεντρώσεις των τριών φυτοφαρμάκων βρίσκονταν σε συγκεντρώσεις, $0,09 \pm 0,02$, $0,09 \pm 0,02$ και $7,8 \pm 0,8$ $\mu\text{g/L}$ για τα φυτοφάρμακα AMPP, GLYP και

GLUF αντίστοιχα. Η ύπαρξη των φυτοφαρμάκων αυτών είναι αναμενόμενη αν και μάλλον χαμηλή, αφού η χρήση τους είναι ευρύτατα διαδεδομένη στη γεωργία.



Σχήμα 3.3.3.1. Χρωματογράφημα SIM δείγματος νερού της λίμνης Παμβώτιδας (Ιωαννίνων). Σειρά έκλουσης: (1) (1-aminopropyl)phosphonic acid, (2) glyphosate, (3) glufosinate

3.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εκχύλιση-προσυγκέντρωση και ο ταυτόχρονος καθαρισμός (clean-up) ενός δείγματος αποτελούν εξίσου σημαντικές διαδικασίες σε μία αναλυτική μέθοδο όσο και η τελική μέτρηση του αναλυτικού σήματος. Τα τελευταία χρόνια υιοθετούνται νέες αποτελεσματικότερες διαδικασίες μικροεκχύλισης, προσυγκέντρωσης και καθαρισμού των δειγμάτων πριν την ανάλυσή τους, με στόχο την ελαχιστοποίηση της χρήσης οργανικών διαλυτών και τη μείωση του χρόνου ανάλυσης. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η σύνθεση κοίλων ινών αλουμίνας, τιτανίας, ζirkονίας, σταννίας, πυριτίας και σύνθετων αλουμίνας-τιτανίας, τιτανίας-ζirkονίας. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προσυγκέντρωση νουκλεοτιδίων από μητρικό γάλα και εμπορικό σκεύασμα βρεφικού γάλακτος σε ίνες αλουμίνας και σταννίας, ενώ πραγματοποιήθηκε και προσυγκέντρωση επιλεγμένων φυτοφαρμάκων σε ίνες αλουμίνας, τιτανίας, ζirkονίας, αλουμίνας-τιτανίας και τιτανίας-ζirkονίας. Από τα αποτελέσματα της διατριβής προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

A. Σχετικά με τη σύνθεση των κοίλων κεραμικών ινών

- Οι κεραμικές κοίλες ίνες παρασκευάζονται με επικάλυψη κοίλης ίνας πολυπροπυλενίου από υδρόλύματα και η ίνα προπυλενίου απομακρύνεται με καύση.
- Πραγματοποιείται η σύνθεση των κεραμικών ινών αλουμίνας, τιτανίας, ζirkονίας, σταννίας, πυριτίας και των σύνθετων αλουμίνας-τιτανίας, τιτανίας-ζirkονίας με sol-gel.
- Δεν είναι εφικτή η σύνθεση κεραμικής ίνας αλουμίνας-σταννίας. Τα δύο αυτά υλικά έχουν διαφορετικές φάσεις, ώστε να μην είναι εφικτή η παρασκευή του σύνθετου κεραμικού υλικού.
- Οι κοίλες ίνες που σχηματίζονται είναι ανθεκτικές σε όλη τη διάρκεια της αναλυτικής πορείας.
- Οι κεραμικές ίνες είναι ισχυρά οξέα κατά Lewis και μπορούν ν' αλληλεπιδρούν με βάσεις κατά Lewis, όπως οι φωσφονικές ομάδες οργανοφωσφορικών ενώσεων. Τα οξείδια αυτά, λοιπόν, αποτελούν κατάλληλα υλικά για τη μικροεκχύλιση-προσυγκέντρωση και καθαρισμό νουκλεοτιδίων και επιλεγμένων φυτοφαρμάκων από βρεφικά γάλατα (μητρικά και εμπορίου) και επιφανειακό νερό αντίστοιχα.

B. Σχετικά με τη προσυγκέντρωση νουκλεοτιδίων σε κοίλες ίνες

- Προτείνεται μία μέθοδος προσδιορισμού μονοφωσφορικών νουκλεοτιδίων σε μητρικά γάλατα και εμπορικά βρεφικά γάλατα με υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης και ανιχνευτή συστοιχίας διόδων.
- Στη HILIC πραγματοποιούνται υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις παρουσία μίγματος υδατο-οργανικών κινητών φάσεων για την δημιουργία μιας στιβάδας νερού στην επιφάνεια της στατικής φάσης μέσα στην οποία οι αναλύτες κατανέμονται με βάση την πολικότητά τους και κατακρατούνται οι πολικές ενώσεις, συνεπώς και τα νουκλεοτίδια.
- Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των νουκλεοτιδίων επιλέγεται η στήληαμιδο-πυριτίας με κινητή φάση αποτελούμενη από: HCOOH 10 mM, pH 3,0 σε αναλογία διαλυτών 75/25 ACN/H₂O (v/v). Επιπλέον, η θερμοκρασία της στήλης είναι 25°C και η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης 1,0 mL/min.
- Λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεων των πέντε νουκλεοτιδίων (CMP, AMP, UMP, IMP, GMP) στα γάλατα και της πολυπλοκότητας της μήτρας, είναι απαραίτητη η προσυγκέντρωση των νουκλεοτιδίων στις κεραμικές ίνεςαλουμίνας και σταννίας, οι οποίες παρουσιάζουν χημική συγγένεια με τα νουκλεοτίδια με αποτέλεσμα να μπορούν σε κατάλληλες συνθήκες να τα προσυγκεντρώνουν.
- Η μέγιστη προσρόφηση των νουκλεοτιδίων στις κοίλες ίνες επιτυγχάνεται στις εξής συνθήκες:
 - ✓ pH του διαλύματος των νουκλεοτιδίων 3,0,
 - ✓ θερμοκρασία ανάδευσης του διαλύματος των νουκλεοτιδίων 40°C,
 - ✓ ταχύτητα ανάδευσης του διαλύματος των νουκλεοτιδίων 300 rpm
 - ✓ όγκος διαλύματος των νουκλεοτιδίων στη προσυγκέντρωση 2,0 mL.

Αντιθέτως, η εκρόφησή τους πραγματοποιείται σε 0,2 mL μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας 1%, για 15 min σε λουτρό υπερήχων.

- Με την διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται προσυγκέντρωση των νουκλεοτιδίων στις κοίλες ίνες αλουμίνας και σταννίας και ταυτόχρονα ο καθαρισμός των δειγμάτων, ενώ επιτρέπεται η ποσοτικοποίηση των νουκλεοτιδίων σε μητρικά και εμπορικά βρεφικά γάλατα.

Γ. Σχετικά με τη προσυγκέντρωση των επιλεγμένων φυτοφαρμάκων σε κοίλες ίνες

- Προτείνεται μία μέθοδος προσδιορισμού επιλεγμένων φυτοφαρμάκων (GLUF, GLYP, BIAL, AMPP) σε επιφανειακό νερό (λίμνης Παμβώτιδας Ιωαννίνων) με αέρια χρωματογραφία και ανιχνευτή φασματομετρία μάζας.
- Πραγματοποιείται η ανάπτυξη μιας μεθόδου παραγωγοποίησης με στόχο τον καλύτερο διαχωρισμό των αναλυτών και τη βελτίωση των χαρακτηριστικών τους στην αέρια χρωματογραφία. Για την παραγωγοποίηση γίνεται χρήση δύο αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης, του ανυδρίτη του τριφθοροξικού οξέος (TFAA) και της 2,2,2- τριφθοροαιθανόλης (TFE). Οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγοποίησης είναι: προσθήκη στο ξηρό υπόλειμμα του υδατικού δείγματος, 150 μl TFE και 300 μl TFAA, παραμονή στους υπέρηχους για 10 min, θέρμανση στους 95°C για 30 min, εξάτμιση των αντιδραστηρίων μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου, προσθήκη οξικού αιθυλεστέρα με δεκαπεντάνιο και στην συνέχεια εισαγωγή του δείγματος στο GC-MS.
- Η προσρόφηση των αναλυτών πραγματοποιείται σε κοίλες ίνες αλουμίνας, τιτανίας, ζirkονίας και σύνθετα υλικά αλουμίνας-τιτανίας, τιτανίας-ζirkονίας και η βέλτιστη προσρόφηση των αναλυτών στις κοίλες ίνες πραγματοποιείται με τις εξής παραμέτρους:
 - ✓ pH του διαλύματος των φυτοφαρμάκων 6,0 για την αλουμίνα, 7,0 για την τιτανία και τη ζirkονία και 6,0 για τα σύνθετα αλουμίνα-τιτανία, τιτανία-ζirkονία,
 - ✓ τα διαλύματα των φυτοφαρμάκων αναδεύονται με τις ίνες για 60 min και
 - ✓ ο όγκος του διαλύματος των φυτοφαρμάκων στη προσυγκέντρωση είναι 50 mL.
- Με την απλή αυτή διαδικασία επιτυγχάνεται προσυγκέντρωση των αναλυτών στις κοίλες ίνες αλουμίνας, τιτανίας, ζirkονίας, αλουμίνας-τιτανίας και τιτανίας-ζirkονίας ενώ επιτρέπεται η ποσοτικοποίησή τους σε επιφανειακό νερό.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Cosgrove M, Nucleotides. *Nutrition*, **1998**, 14, 748-751.
- [2] Gill B.D., Indyk H.E., Development and application of a liquid chromatographic method for analysis of nucleotides and nucleosides in milk and infant formulas. *International Dairy Journal*, **2007**, 17, 596-605.
- [3] Inoue K., Obara R., Hino T., Oka H., Development and Application of an HILIC-MS/MS Method for the Quantitation of Nucleotides in Infant Formula. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**, 58, 9918-9924.
- [4] Alles M.S., Scholtens P.A.M.J., Bindels J.G. Current trends in the composition of infant milk formulas. *Current Paediatrics*, **2004**, 14, 51-63.
- [5] Singhal A., Kennedy K., Lanigan J., Clough H., Jenkins W., Elias-Jones A., Stephenson T., Dudek P., Lucas A. Dietary Nucleotides and Early Growth in Formula-Fed Infants: A Randomized Controlled Trial, *Pediatrics*, **2013**, 126, 946-953.
- [6] Yu V.Y.H., Scientific rationale and benefits of nucleotide supplementation of infant formula, *Journal of Paediatrics and Child Health*, **2002**, 38, 543-549.
- [7] Viñas P., Campillo N., López-García I., Martínez-López S., Vasallo I., Hernández-Córdoba M., Anion Exchange Liquid Chromatography for the Determination of Nucleotides in Baby and/or Functional Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**, 57, 7245-7249.
- [8] Ferreira I.M.P.L.V.O., Mendes E., Gomes A.M.P., Faria M.A., Ferreira M.A., The determination and distribution of nucleotides in dairy products using HPLC and diode array detection. *Food Chemistry*, **2001**, 74, 239-244.
- [9] Perrin C., Meyer L., Mujahid C., Blake C.J., The analysis of 5-mononucleotides in infant formulae by HPLC, *Food Chemistry*, **2001**, 74, 245-253.

- [10] Sugawara M., Sato N., Nakano T., Idota T., Nakajima I., Profile of Nucleotides and Nucleosides of Human Milk. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **1995**, 41, 409-418.
- [11] Liao K.-Y., Wu T.-C., Huang C.-F., Lin C.-C., Huang I.F., Wu L., Profile of Nucleotides and Nucleosides in Taiwanese Human Milk, *Pediatrics & Neonatology*, **2011**, 52, 93-97.
- [12] Carver J.D., Allan Walker W. The role of nucleotides in human nutrition. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **1995**, 6, 58-72.
- [13] Yau K.-I.T., Huang C.-B., Chen W., Chen S.-J., Chou Y.-H., Huang F.-Y., Kua K.E., Chen N., McCue M., Alarcon P.A., Tressler R.L., Comer G.M., Baggs G., Merritt R.J., Masor M.L., Effect of Nucleotides on Diarrhea and Immune Responses in Healthy Term Infants in Taiwan. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **2003**, 36, 37-43.
- [14] McMillan J.A., Oski F.A., Lourie G., Tomarelli R.M., Landaw S.A., Iron absorption from human milk, simulated human milk, and proprietary formula. *Pediatrics*, **1977**, 60, 896.
- [15] György P., Biochemical aspects of human milk. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1971**, 24, 970.
- [16] Cosgrove M., Davies D.P., Jenkins H.R., Nucleotide supplementation and the growth of term small for gestational age infants and the growth of term small for gestational age infants. *Arch. Dis. Child*, **1996**, 74, 122-125.
- [17] Sánchez-Pozo A., L. Pita M., Martinez A., Molina J.A., Sánchez-Medina F., Gill A. Effects of dietary nucleotides upon lipoprotein pattern of newborn infants. *Nutrition Research*, **1986**, 6, 763-771.

- [18] Siahianidou T., Mandyla H., Papassotiriou I., Anagnostakis D., Serum Lipids in Preterm Infants Fed a Formula Supplemented With Nucleotides. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **2004**, 38, 56-60.
- [19] Gil A., Corra I. E., Martinez A., Molina J. Effects of the addition of nucleotides to an adapted milk formula on the microbial pattern of faeces in at-term newborn infants. *J. Clin. Nutr. Gastroenterol.*, **1986**, 1, 127-132.
- [20] Pickering L.K., Granoff D.M., Erickson J.R., Modulation of the immune system by human milk and infant formula containing nucleotides. *Pediatrics*, **1998**, 101, 242-249.
- [21] Navarro J., Maldonada J., Narbona E., Influence of dietary nucleotides on plasma immunoglobulin levels and lymphocyte subsets of preterm infants. *Biofactors*, **1999**, 10, 67-76.
- [22] Kulkarni A.D. , Fanslow W.C., Rudolph F.B., Van Buren CT., Effect of dietary nucleotides in response to bacterial infections. *JPEN*, **1986**, 10, 169.
- [23] Carver J.D., Dietary nucleotides: effects on the immune and gastrointestinal systems. *Acta Paediatrica*, **1999**, 88, 83-88.
- [24] Carver J.D., Pimental B., Cox W.I., Barness L.A., Dietary nucleotide effects upon immune function in infants. *Pediatrics*, **1991**, 88,359.
- [25] Fanslow W.C., Kulkarni A.D., Van Buren C.T., Rudolph F.B., Effect of nucleotide restriction and supplementation on resistance to experimental murine candidiasis. *JPEN*, **1998**, 12, 49.
- [26] Rudolph F.B., Kulkarni A.D., Schandle V.B., Van Buren C.T., Involvement of dietary nucleotides in T lymphocyte function. *Adv Exp Med Biol*, **1984**, 165-175.

- [27] Brunser O., Espinoza J., Araya M., Cruchet S., Gil A., Effect of dietary nucleotide supplementation on diarrhoeal disease in infants. *Acta Paediatrica*, **1994**, 83, 188-191.
- [28] Schaller J.P., Kuchan M.J., Thomas D.L., Cordle C.T., Winship T.R., Buck R.H., Baggs G.E., Wheeler J.G., Effect of Dietary Ribonucleotides on Infant Immune Status. Part 1: Humoral Responses. *Pediatr Res*, **2004**, 56, 883-890.
- [29] Torres-Lopez M.I., Fernandez I., Fontana L., Gil A., Rios A., Influence of dietary nucleotides on liver structural recovery and hepatocyte binuclearity in cirrhosis induced by thioacetamide. *Gut*, **1996**, 38, 260-264.
- [30] Quan R., Gil A., Uauy R., Effect of dietary nucleosides (DN) on intestinal growth and maturation after injury from radiation. *Pediatr Res*, **1991**, 29, 111A.
- [31] Uauy R., Stringel G., Thomas R., Quan R., Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **1990**, 10, 497.
- [32] Nuñez M.C., Ayudarte M.V., Morales D., Suarez M.D., Gil A., Effect of dietary nucleotides on intestinal repair in rats with experimental chronic diarrhea. *JPEN*, **1990**, 14, 598.
- [33] Oliveira C., Ferreira I.M.P.L.V.O., Mendes E.L., Ferreira M., Development and application of an HPLC/DIODE array methodology for determination of nucleotides in infant formulae and follow-up milks. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **1999**, 22, 571-578.
- [34] Hess J.R., Greenberg N.A., The role of nucleotides in the immune and gastrointestinal systems: Potential clinical applications. *Nutrition in Clinical Practice*, **2012**, 27, 281-294.

- [35] Soga T., Imaizumi M., Capillary electrophoresis method for the analysis of inorganic anions, organic acids, amino acids, nucleotides, carbohydrates and other anionic compounds. *Electrophoresis*, **2011**, 22, 3418-3425.
- [36] Uhrová M., Deyl Z., Suchánek M., Separation of common nucleotides, mono-, di- and triphosphates, by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **1996**, 68, 99-105.
- [37] Steiner A.L., Joel G., Hardman B.W.O.M., Assay of cyclic nucleotides by radioimmunoassay methods. In: *Methods in Enzymology*, Academic Press, pp. 96-105
- [38] Sarada K., Epstein P.M., Strada S.J., Thompson W.J. Analysis of cyclic nucleotide phosphodiesterase(s) by radioimmunoassay. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1982**, 215, 183-198.
- [39] Dingle J.R., Hines J.A., Fraser D.I., Post-mortem degradation of adenine nucleotides in muscle of the lobster, homarus americanus. *Journal of Food Science*, **1968**, 33, 100-103.
- [40] Fraga H., Fontes R., Enzymatic synthesis of mono and dinucleoside polyphosphates. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2010**, 1810, 1195-1204.
- [41] Kremmer T., Boldizsar M., Holczinger L., Comparison of high-performance ion-exchange and ion-pair liquid chromatographic methods for the separation of tumour cell nucleotides. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **1987**, 415, 53-63.
- [42] Bai Q.Y., Zelles L., Scheunert I., Korte F., Determination of adenine nucleotides in soil by ion-paired reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Microbiological Methods*, **1989**, 9, 345-351.
- [43] Sawada S., Ono R., Sato T., Suzuki S., Arakawa O., Kasai M., Determination of sugar phosphates and nucleotides related to photosynthetic metabolism by high-

performance anion-exchange liquid chromatography with fluorometric and ultraviolet detection. *Analytical Biochemistry*, **2003**, 314, 63-69.

[44] Qian T., Cai Z., Yang M.S., Determination of adenosine nucleotides in cultured cells by ion-pairing liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, **2004**, 325, 77-84.

[45] Riondet C., Morel S., Alcaraz Gr., Determination of total ribonucleotide pool in plant materials by high-pH anion-exchange high-performance liquid chromatography following extraction with potassium hydroxide. *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1077, 120-127.

[46] Yoshida T., Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **2004**, 60, 265-280.

[47] Mora L., Hernández-Cázares A.S., Aristoy M.-C., ToldáF., Hydrophilic interaction chromatographic determination of adenosine triphosphate and its metabolites. *Food Chemistry*, **2010**, 123, 1282-1288.

[48] Ikegami T., Tomomatsu K., Takubo H., Horie K., Tanaka N., Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2008**, 1184, 474-503.

[49] Philibert G.S., Olesik S., Characterization of enhanced-fluidity liquid hydrophilic interaction chromatography for the separation of nucleosides and nucleotides, *Journal of Chromatography A*, **2011**, 1218, 8222-8230.

[50] Hemström P., Irgum K., Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*, **2006**, 29, 1784-1821.

[51] Gama M.R., da Costa Silva R.G., Collins C.H., Bottoli C.B.G., Hydrophilic interaction chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, **2012**, 37, 48-60.

- [52] Garcia-Gomez D., Rodríguez-Gonzalo E., Carabias-Martínez R., Stationary phases for separation of nucleosides and nucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, **2013**, 47, 111-128.
- [53] Dejaegher B., Vander Heyden Y., HILIC methods in pharmaceutical analysis. *Journal of Separation Science*, **2010**, 33, 698-715.
- [54] Karatapanis A.E., Fiamegos Y.C., Stalikas C.D., A revisit to the retention mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography using model organic compounds. *Journal of Chromatography A*, **2011**, 1218, 2871-2879.
- [55] Paparizou E.C., Karatapanis A.E., Stalikas C.D. Determination of saccharides in aerosols by hydrophilic interaction liquid chromatography-evaporative light scattering detection after preconcentration/ clean-up on magnetic titania. *Analytical Methods*, **2013**, 5, 2802-2808.
- .
- [56] Mitchell C.R., Bao Y., Benz N.J., Zhang S., Comparison of the sensitivity of evaporative universal detectors and LC/MS in the HILIC and the reversed-phase HPLC modes. *Journal of Chromatography B*, **2009**, 877, 4133-4139.
- [57] Jandera P., Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta*, **2011**, 692, 1-25.
- [58] Gregor H.P., Collins F.C., Pope M., Studies on ion-exchange resins. III. Diffusion of neutral molecules in a sulfonic acid cation-exchange resin. *Journal of Colloid Science*, **1951**, 6, 304-322.
- [59] Samuelson O. S.E., Utilization of Ion Exchangers in Analytical Chemistry. XXIV Isolation of Monosaccharides. *Sven.Kem. Tidskr.*, **1952**, 64, 305-314.
- [60] Rückert H. S.O., Adsorption of sugars on ion exchangers from ethyl alcohol-water solutions, *Sven.Kem. Tidskr.*, **1954**, 66, 337-344.

- [61] Linden J.C., Lawhead C.L., Liquid chromatography of saccharides. *Journal of Chromatography A*, **1975**, 105, 125-133.
- [62] Palmer J.K., A Versatile System for Sugar Analysis via Liquid Chromatography. *Analytical Letters Taylor & Francis*, **1975**, 8, 215-224.
- [63] Verhaar L.A.T., Kuster B.F.M., Contribution to the elucidation of the mechanism of sugar retention on amine-modified silica in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1982**, 234, 57-64.
- [64] Orth P. E.H. Separation of sugars on chemically modified silica gel. *Chromatographia*, **1982**, 15, 91-96.
- [65] Nikolov Z.L., Reilly P.J., Retention of carbohydrates on silica and amine-bonded silica stationary phases: application of the hydration model. *Journal of Chromatography A*, **1985**, 325, 287-293.
- [66] Alpert A.J., Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography for Isocratic Separation of Charged Solutes and Selective Isolation of Phosphopeptides. *Analytical Chemistry*, **2007**, 80, 62-76.
- [67] Paul J. Boersema, S.M., Heck A.J.R., Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2008**, 391, 151-159.
- [68] Hao C., Morse D., Morra F., Zhao X., Yang P., Nunn B., Direct aqueous determination of glyphosate and related compounds by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using reversed-phase and weak anion-exchange mixed-mode column. *Journal of Chromatography A*, **2011**, 1218, 5638-5643.
- [69] Olsen B.A., Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. *Journal of Chromatography A*, **2001**, 913, 113-122.

- [70] Pack B.W., Risley D.S., Evaluation of a monolithic silica column operated in the hydrophilic interaction chromatography mode with evaporative light scattering detection for the separation and detection of counter-ions. *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1073, 269-275.
- [71] Strege M.A., Hydrophilic Interaction Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry Analysis of Polar Compounds for Natural Product Drug Discovery. *Analytical Chemistry*, **1998**, 70, 2439-2445.
- [72] Zhou T., Lucy C.A., Hydrophilic interaction chromatography of nucleotides and their pathway intermediates on titania. *Journal of Chromatography A*, **2008**, 1187, 87-93.
- [73] Nguyen H.P., Schug K.A., The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications. *J.Sep.Sci.*, **2008**, 31, 1465-1480.
- [74] Alpert A.J., Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A*, **1990**, 499, 177-196.
- [75] Alpert A.J., Shukla M., Shukla A.K., Zieske L.R., Yuen S.W., Ferguson M.A.J., Mehlert A., Pauly M., Orlando R., Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates, *Journal of Chromatography A*, **1994**, 676, 191-202.
- [76] Wang X., Li W., Rasmussen H.T., Orthogonal method development using hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography for the determination of pharmaceuticals and impurities. *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1083, 58-62.
- [77] McCalley D.V., Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1171, 46-55.

- [78] Appelblad P., Jonsson T., Jiang W., Irgum K., Fast hydrophilic interaction liquid chromatographic separations on bonded zwitterionic stationary phase. *Journal of Separation Science*, **2008**, 31, 1529-1536.
- [79] Ali M.S., Ghorri M., Rafiuddin S., Khatri A.R., A new hydrophilic interaction liquid chromatographic (HILIC) procedure for the simultaneous determination of pseudoephedrine hydrochloride (PSH), diphenhydramine hydrochloride (DPH) and dextromethorphan hydrobromide (DXH) in cough-cold formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2007**, 43, 158-167.
- [80] P.R.W. S Chrom-Ed Book Series, LIBRARYSCIENCE, LLC, **2001**, 55-59
- [81] Hao Z., Lu C.-Y., Xiao B., Weng N., Parker B., Knapp M., Ho C.-T., Separation of amino acids, peptides and corresponding Amadori compounds on a silica column at elevated temperature. *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1147, 165-171.
- [82] Jandera P., Hájek T., Utilization of dual retention mechanism on columns with bonded PEG and diol stationary phases for adjusting the separation selectivity of phenolic and flavone natural antioxidants. *Journal of Separation Science*, **2009**, 32, 3603-3619.
- [83] Spielmeyer A., Pohnert G., Direct quantification of dimethylsulfonylpropionate (DMSP) with hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **2010**, 878, 3238-3242.
- [84] Chirita R.-I., West C., Finaru A.-L., Elfakir C., Approach to hydrophilic interaction chromatography column selection: Application to neurotransmitters analysis. *Journal of Chromatography A*, **2010**, 1217, 3091-3104.
- [85] Guo Y., Gaiki S., Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2011**, 1218, 5920-5938.

- [86] Lindberg R.H., Fedorova G., Blum K.M., Pulit-Prociak J., Gillman A., Järhult J., Appelblad P., Söderström H., Online solid phase extraction liquid chromatography using bonded zwitterionic stationary phases and tandem mass spectrometry for rapid environmental trace analysis of highly polar hydrophilic compounds -Application for the antiviral drug Zanamivir. *Talanta*, **2015**, 141, 164-169.
- [87] Idborg H., Zamani L., Edlund P.-O., Schuppe-Koistinen I., Jacobsson S.P., Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS: Part 1. Analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **2005**, 828, 9-13.
- [88] Wade K.L., Garrard I.J., Fahey J.W., Improved hydrophilic interaction chromatography method for the identification and quantification of glucosinolates. *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1154, 469-472.
- [89] Oertel R., Neumeister V., Kirch W., Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum. *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1058, 197-201.
- [90] Takegawa Y., Deguchi K., Keira T., Ito H., Nakagawa H., Nishimura S.-I., Separation of isomeric 2-aminopyridine derivatized N-glycans and N-glycopeptides of human serum immunoglobulin G by using a zwitterionic type of hydrophilic-interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1113, 177-181.
- [91] Directive 76/464/EEC PCbCDSditAEotCBL, Off. J. Eur. Commun., L129/7 (1976). (1976) Directive 76/464/EEC, Pollution Caused by Certain Dangerous Substances Discharged into the Aquatic Environment of the Community (Black List), Off. J. Eur. Commun., L129/7 Directive 76/464/EEC, Pollution Caused by Certain Dangerous Substances Discharged into the Aquatic Environment of the Community (Black List), Off. J. Eur. Commun., L129/7)
- [92] US Environmental Protection Agency NPSPiRP--NTIS, Springfield, VA (1990)

- [93] US Environmental Protection Agency NSoPiDWWPIRE--NTIS, Springfield, VA (1992)
- [94] Electronic Code of Federal Regulations P-TaEfPCRiFHheggcttt-icese
- [95] Council Directive 91/414/EEC EU, Brussels, 1991
- [96] Chen M.-X., Cao Z.-Y., Jiang Y., Zhu Z.-W., Direct determination of glyphosate and its major metabolite, aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **2013**, 1272, 90-99.
- [97] Stalikas C.D., Konidari C.N., Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. *Journal of Chromatography A*, **2001**, 907, 1-19.
- [98] Council Directive 80/778/EEC EU, Brussels, 1980.
- [99] Standardization Administration of China and Ministry of Health of the People's Republic of China Mrlfpif, GB 2763-2005
- [100] http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm. PE-MH
- [101] Duke S.D., Kearney P.C., Herbicides – Chemistry, Degradation and Mode of Action, Marcel Dekker, New York , (Eds.) DDK **1988**, 1.
- [102] Malik J., Barry G., Kishore G, *BioFactors*, **1989**, 2, 17.
- [103] Environmental Health Criteria: GlyphosateWorld Health Organization G
- [104] Bolognesi C., Bonatti S., Degan P., Gallerani E., Peluso M., Rabboni R., Roggieri P., Abbondandolo A., Genotoxic Activity of Glyphosate and Its Technical Formulation Roundup. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 1957-1962.

- [105] Stalikas C.D., Pilidis G.A., Development of a method for the simultaneous determination of phosphoric and amino acid group containing pesticides by gas chromatography with mass-selective detection: Optimization of the derivatization procedure using an experimental design approach. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 872, 215-225.
- [106] Zouaoui K., Dulaurent S., Gaulier J.M., Moesch C., Lachâtre G. Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: About 13 cases of acute intoxication. *Forensic Science International*, **2013**, 226. 20-25.
- [107] George J., Prasad S., Mahmood Z., Shukla Y., Studies on glyphosate-induced carcinogenicity in mouse skin: A proteomic approach. *Journal of Proteomics*, **2010**, 73, 951-964.
- [108] Wei X., Gao X., Zhao L., Peng X., Zhou L., Wang J., Pu Q., Fast and interference-free determination of glyphosate and glufosinate residues through electrophoresis in disposable microfluidic chips. *Journal of Chromatography A*, **2013**, 1281:148-154.
- [109] Stella J., Ryan M., Glyphosate herbicide formulation: A potentially lethal ingestion. *Emergency Medicine*, **2004**, 16, 235-239.
- [110] Sprankle P., Meggitt W.F., Penne D. *Weed Sci.*, **1975**, 23, 229.
- [111] Faber M.J., Stephenson G.R., Thompson D.G. Persistence and Leachability of Glufosinate-Ammonium in a Northern Ontario Terrestrial Environment. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 3672-3676.
- [112] Yoshioka N., Asano M., Kuse A., Mitsuhashi T., Nagasaki Y., Ueno Y., Rapid determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos, and their major metabolites in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2011**, 1218:3675-3680.

- [113] Behrendt H., Matthies M., Gildemeister H., Görlitz G., Leaching and transformation of glufosinate-ammonium and its main metabolite in a layered soil column. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **1990**, 9, 541-549.
- [114] Murakami T., Anzai H., Imai S., Satoh A., Nagaoka K., Thompson C. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: Molecular cloning and characterization of the gene cluster. *Molecular and General Genetics MGG*, **1986**, 205, 42-53.
- [115] Young J.C., Khan S.U., Marriage P.B., Fluorescence detection and determination of glyphosate via its N-nitroso derivative by thin-layer chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **1977**, 25, 918-922.
- [116] Roseboom H., Berkhoff C.J., Determination of the herbicide glyphosate and its major metabolite aminomethylphosphonic acid by high-performance liquid chromatography after fluorescence labelling. *Analytica Chimica Acta*, **1982**, 135, 373-377.
- [117] Patsias J., Papadopoulou A., Papadopoulou-Mourkidou E. Automated trace level determination of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water by on-line anion-exchange solid-phase extraction followed by cation-exchange liquid chromatography and post-column derivatization. *Journal of Chromatography A*, **2001**, 932, 83-90.
- [118] Hayama .T, Yoshida H., Todoroki K., Nohta H., Yamaguchi M. Determination of polar organophosphorus pesticides in water samples by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2008**, 22, 2203-2210.
- [119] Cikalo M.G., Goodall D.M., Matthews W., Analysis of glyphosate using capillary electrophoresis with indirect detection. *Journal of Chromatography A*, **1996**, 745, 189-200.

- [120] Molina M., Silva M., Simultaneous determination of phosphorus-containing amino acid-herbicides by nonionic surfactant micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. *ELECTROPHORESIS*, **2001**, 22, 1175-1181.
- [121] Chang S.Y., Liao C.-H., Analysis of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid by capillary electrophoresis with indirect fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, **2002**, 959, 309-315.
- [122] Borjesson E., Torstensson L. New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in water and soil. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 886, 207-216.
- [123] Struger J., Thompson D., Staznik B., Martin P., McDaniel T., Marvin C. Occurrence of Glyphosate in Surface Waters of Southern Ontario. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **2008**, 80, 378-384.
- [124] Kudzin Z.H., Gralak D.K., Drabowicz Jz., Euczak J Novel approach for the simultaneous analysis of glyphosate and its metabolites. *Journal of Chromatography A*, **2002**, 947, 129-141.
- [125] Pauling L., Robinson A.B., Teranishit R., CARY P. Quantitative Analysis of Urine Vapor and Breath by Gas-Liquid Partition Chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the united states of america*, **1971**, 68, , 2374-2376.
- [126] Inoue Y., Kuhara T., Rapid and sensitive method for prenatal diagnosis of propionic acidemia using stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry and urease pretreatment. *Journal of Chromatography B*, **2002**, 776, 71-77.
- [127] Kuhara T., Ohse M., Inoue Y., Cooper A.L., Erratum to: A GC/MS-based metabolomic approach for diagnosing citrin deficiency. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2011**, 400, 2271-2271.

- [128] Kataoka H., Ryu S., Sakiyama N., Makita M., Simple and rapid determination of the herbicides glyphosate and glufosinate in river water, soil and carrot samples by gas chromatography with flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*, **1996**, 726, 253-258.
- [129] Preu M., Guyot D., Petz M., Development of a gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions. *Journal of Chromatography A*, **1998**, 818, 95-108.
- [130] Zhang J., Lee H.K., Application of liquid-phase microextraction and on-column derivatization combined with gas chromatography mass spectrometry to the determination of carbamate pesticides. *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1117, 31-37.
- [131] Arkan T., Molnár-Perl I., The role of derivatization techniques in the analysis of glyphosate and aminomethyl-phosphonic acid by chromatography. *Microchemical Journal*, **2015**, 121, 99–106.
- [132] Husek P., Wilson I.D., CHROMATOGRAPHY: GAS | Derivatization. In: Encyclopedia of Separation Science Academic Press, Oxford, **2000**, 434-443.
- [133] Seung-Jin K., Avvaru Praveen K., Lee Y.-I., Enhanced Detection and Structural Characterization of Flavonoids by Complexation with N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Sciences*, **2008**, 24, 1177-1182.
- [134] Zhang K., Zuo Y., Pitfalls and solution for simultaneous determination of estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry after derivatization with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 554, 190-196.

- [135] Zuo Y., Zhang K., Lin Y., Microwave-accelerated derivatization for the simultaneous gas chromatographic-mass spectrometric analysis of natural and synthetic estrogenic steroids. *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1148:211-218.
- [136] Little J.L., Artifacts in trimethylsilyl derivatization reactions and ways to avoid them. *Journal of Chromatography A*, **1999**, 844, 1-22.
- [137] Koek M., Jellema R., van der Greef J., Tas A., Hankemeier T., Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. *Metabolomics*, **2011**, 7, 307-328.
- [138] Zampolli M.G., Basaglia G., Dondi F., Sternberg R., Szopa C., Pietrogrande M.C., Gas chromatography-mass spectrometry analysis of amino acid enantiomers as methyl chloroformate derivatives: Application to space analysis. *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1150, 162-172.
- [139] Zampolli M., Meunier D., Sternberg R., Raulin F., Szopa C., Pietrogrande M.C., Dondi F., GC-MS analysis of amino acid enantiomers as their N(O,S)-perfluoroacyl perfluoroalkyl esters: Application to space analysis. *Chirality*, **2006**, 18, 279-295.
- [140] Deyrup C.L., Chang S.M., Weintraub R.A., Moye H.A., Simultaneous esterification and acylation of pesticides for analysis by gas chromatography. 1. Derivatization of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid with fluorinated alcohols-perfluorinated anhydrides. *J. Agric. Food Chem.*, **1985**, 33, 944-947.
- [141] Konar S.K., Roy D.N., Method for the determination of residues of the herbicide glyphosate and its principal metabolite, aminomethylphosphonic acid, in plant materials by nitrogen-selective gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **2000**, 229, 277-280.
- [142] Stalikas C., Pilidis G., Karayannis M., An integrated gas chromatographic method towards the simultaneous determination of phosphoric and amino acid group containing pesticides. *Chromatographia*, **2000**, 51, 741-746.

- [143] Roy D.N., Konar S.K., Development of an analytical method for the determination of glyphosate and (aminomethyl) phosphonic acid residues in soils by nitrogen-selective gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **1989**, 37, 441-443.
- [144] Eberbach P.L., Douglas L.A., Method for the determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in soil using electron capture gas chromatography . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1991**, 39, 1776-1780.
- [145] Karamani A.A., Fiamegos Y.C., Vartholomatos G., Stalikas C.D. Fluoroacetylation/fluoroethylesterification as a derivatization approach for gas chromatography-mass spectrometry in metabolomics: Preliminary study of lymphohyperplastic diseases. *Journal of Chromatography A*, **2013**, 1302, 125– 132.
- [146] Xu .L., Lee H.K., Synthesis and characterization of hollow glass microspheres coated by SnO₂ nanoparticles. *Analytical Chemistry*, **2007**, 79, 5241-5248.
- [147] Chandradass J., Balasubramanian M. Sol-gel processing of alumina fibres. *Journal of Materials Processing Technology*, **2006**, 173:275-280.
- [148] Liu S., Li K., Hughes R. Preparation of porous aluminium oxide (Al₂O₃) hollow fibre membranes by a combined phase-inversion and sintering method. *Ceramics International*, **2003**, 29, 875-881.
- [149] Li J., Qi H.-Y., Shi Y.-P., Applications of titania and zirconia hollow fibers in sorptive microextraction of N,N-dimethylacetamide from water sample. *Analytica Chimica Acta*, **2009**, 651, 182-187.
- [150] Cui C., He M., Hu B., Membrane solid phase microextraction with alumina hollow fiber on line coupled with ICP-OES for the determination of trace copper, manganese and nickel in environmental water samples. *Journal of Hazardous Materials*, **2011**, 187, 379-385.

- [151] Li J., Qi H.Y., Shi Y.P., Determination of melamine residues in milk products by zirconia hollow fiber sorptive microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2009**, 1216, 5467-5471.
- [152] Melghit K., Mohammed A.K., Al-Amri I., Chimie douce preparation, characterization and photocatalytic activity of nanocrystalline SnO₂. *Materials Science and Engineering: B*, **2005**, 117, 302-306.
- [153] Torres Martinez D.Y., Castanedo Perez R., Torres Delgado G., Zelaya Angel, Structural, morphological, optical and photocatalytic characterization of ZnO-SnO₂ thin films prepared by the sol-gel technique. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2012**, 235, 49-55.
- [154] Li J., Zhang H-F, Shi Y-P Application of SiO₂ hollow fibers for sorptive microextraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of organochlorine pesticides in herbal matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2010**, 398:1501-1508.
- [155] Peters T.A., Fontalvo J., Vorstman M.A.G., Benes N.E., Dam R.Av., Vroon Z.A.E.P., Soest-Vercammen E.L.Jv., Keurentjes J.T.F., Hollow fibre microporous silica membranes for gas separation and pervaporation: Synthesis, performance and stability. *Journal of Membrane Science*, **2005**, 248, 73-80.
- [156] Heiba Z.K., Ahmed M.A., Ahmed S.I., Structural investigations of nanomixed oxides SnO₂-xAl₂O₃ prepared by sol-gel technique. *Journal of Alloys and Compounds*, **2010**, 507:253-256.
- [157] Liu S., Li K., Preparation TiO₂/Al₂O₃ composite hollow fibre membranes. *Journal of Membrane Science*, **2003**, 218, 269-277.
- [158] Satishkumar G., Titelman L., Landau M.V., Mechanism for the formation of tin oxide nanoparticles and nanowires inside the mesopores of SBA-15. *Journal of Solid State Chemistry*, **2009**, 182, 2822-2828.

- [159] Kraleva E., Saladino M.L., Matassa R., Caponetti E., Enzo S., Spojakina A., Phase formation in mixed TiO_2 - ZrO_2 oxides prepared by sol-gel method. *Journal of Structural Chemistry*, **2011**, 52, 330-339.
- [160] Venkatesh R., Ramanan S.R., Influence of processing variables on the microstructure of sol-gel spun alumina fibres. *Materials Letters*, **2002**, 55, 189-195.
- [161] Venkatesh R., Chakrabarty P.K., Siladitya B., Chatterjee M., Ganguli D., Preparation of alumina fibre mats by a sol-gel spinning technique. *Ceramics International*, **1999**, 25, 539-543.
- [162] Chatterjee M., Naskar M.K., Chakrabarty P.K., Ganguli D., Sol-gel alumina fibre mats for high-temperature applications. *Materials Letters*, **2002**, 57, 87-93.
- [163] Venkatesh R., Ramanan S.R., Effect of organic additives on the properties of sol-gel spun alumina fibres. *Journal of the European Ceramic Society*, **2000**, 20, 2543-2549.
- [164] Chiou Y.H., Tsai M.T., Shih H.C., The preparation of alumina fibre by sol-gel processing. *Journal of Materials Science*, **1994**, 29, 2378-2388.
- [165] Ünal Ö., Lagerlöf K.P.D., Tensile Properties of Alumina Fibers Using Hot-Grips. *Journal of the American Ceramic Society*, **1994**, 77, 2609-2614.
- [166] Lucuta P.G., Halliday J.D., Christian B., Phase evolution in Al_2O_3 fibre prepared from an oxychloride precursor. *Journal of Materials Science*, **1992**, 27, 6053-6061.
- [167] Lavaste V., Berger M.H., Bunsell A.R., Besson J., Microstructure and mechanical characteristics of alpha-alumina-based fibres. *Journal of Materials Science*, **1995**, 30, 4215-4225.
- [168] Meagher L., Franks G.V., Gee M.L., Scales P.J., Interaction forces between α -alumina fibres in aqueous electrolyte measured with an atomic force microscope.

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **1999**, 146, 123-137.

[169] Greenwood R., Kendall K., Bellon O., A method for making alumina fibres by co-extrusion of an alumina and starch paste. *Journal of the European Ceramic Society*, **2001**, 21, 507-513.

[170] Unal O., Lagerlof K.P.D., Hot-Grip Tensile Method for Alumina-Fiber Testing. *Journal of the American Ceramic Society*, **1993**, 76, 3167-3169.

[171] Sakuma Y., Iwanaga K., Tsujimoto T., Yoshimoto T., Okada M., Miyata K., Iwanaga H., Neutron-irradiation effect on the mechanical properties of alumina fiber. *Journal of Nuclear Materials*, **1998**, 254, 243-248.

[172] Allahverdi M., Drew R.A.L., Strom-Olsen J.O., Melt-extracted oxide ceramic fibres- the fundamentals. *Journal of Materials Science*, **1996**, 31, 1035-1042.

[173] Yogo T., Iwahara H., Synthesis of polycrystalline alumina fibre with aluminium chelate precursor. *Journal of Materials Science*, **1991**, 26, 5292-5296.

[174] Kong J., Deng H., Yang P., Chu J. Synthesis and properties of pure and antimony-doped tin dioxide thin films fabricated by sol-gel technique on silicon wafer. *Materials Chemistry and Physics*, **2009**, 114, 854-859.

[175] Zhong X., Yang B., Zhang X., Jia J., Yi G., Effect of calcining temperature and time on the characteristics of Sb-doped SnO₂ nanoparticles synthesized by the sol-gel method. *Particuology*, **2012**, 10, 365-370.

[176] Aziz M., Saber Abbas S., Wan Baharom W.R. Size-controlled synthesis of SnO₂ nanoparticles by sol-gel method. *Materials Letters*, **2013**, 91, 31-34.

[177] Aziz M., Abbas S.S., Baharom W.R.W., Mahmud W.Z.W., Structure of SnO₂ nanoparticles by sol-gel method. *Materials Letters*, **2012**, 74:62-64.

- [178] Korosi L., Papp S., Meynen V., Cool P., Vansant E.F., Dekanya I., Preparation and characterization of SnO₂ nanoparticles of enhanced thermal stability: The effect of phosphoric acid treatment on SnO₂·nH₂O. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2005**, 268, 147-154.
- [179] Krishnakumar T., Jayaprakash R., Pinna N., Singh V.N., Mehta B.R., Phani A.R., Microwave-assisted synthesis and characterization of flower shaped zinc oxide nanostructures. *Materials Letters*, **2009**, 63, 242-245.
- [180] Krishnakumar T., Jayaprakash R., Parthibavarman M., Phani A.R., Singh V.N., Mehta B.R., Microwave-assisted synthesis and investigation of SnO₂ nanoparticles. *Materials Letters*, **2009**, 63, 896-898.
- [181] Firooz A.A. Mahjoub A.R., Khodadadi A.A., Preparation of SnO₂ nanoparticles and nanorods by using a hydrothermal method at low temperature. *Materials Letters*. **2008**, 62, 1789-1792.
- [182] Vallet-Regí M., Balas F., Arcos D., Mesoporous Materials for Drug Delivery. *Angewandte Chemie International Edition*, **2007**, 46, 7548-7558.
- [183] Wu K.C.W., Jiang X., Yamauchi Y., New trend on mesoporous films: precise controls of one-dimensional (1D) mesochannels toward innovative applications. *Journal of Materials Chemistry*, **2011**, 21:8934-8939.
- [184] Zhuang L., Ma B., Chen S., Hou X., Chen S. Fast synthesis of mesoporous silica materials via simple organic compounds templated sol-gel route in the absence of hydrogen bond. *Microporous and Mesoporous Materials*, **2015**, 213, 22-29.
- [185] Aguado J., van Grieken R., López-Munõz María-Jo., Marugán J., A comprehensive study of the synthesis, characterization and activity of TiO₂ and mixed TiO₂/SiO₂ photocatalysts *Applied Catalysis A: General*, **2006**, 312, 202-212.
- [186] Hirano M., Nakahara C., Ota K., Tanaike O., Inagaki M., Photoactivity and phase stability of ZrO₂-doped anatase-type TiO₂ directly formed as nanometer-sized

particles by hydrolysis under hydrothermal conditions. *Journal of Solid State Chemistry*, **2003**, 170, 39-47.

[187] Colon G., Hidalgo M.C., Navio J.A., Effect of ZrO₂ incorporation and calcination temperature on the photocatalytic activity of commercial TiO₂ for salicylic acid and Cr(VI) photodegradation. *Applied Catalysis A: General*, **2002**, 231, 185-199.

[188] Liu H-Y, Hou X-Q, Wang X-Q, Wang Y-L, Xu D., Wang C., Du W., Lü M-K, Yuan D-R., Fabrication of High-Strength Continuous Zirconia Fibers and Their Formation Mechanism Study. *Journal of the American Ceramic Society*, **2004**, 87, 2237-2241.

[189] Gawel B., Gawel K., Øye G., Sol-Gel Synthesis of Non-Silica Monolithic Materials. *Materials*, **2010**, 3, 2815-2833.

[190] Phule! P.P., Wood T.E. *Ceramics and Glasses, Sol-Gel Synthesis of*.

[191] Mathur S., Driess M., Crabtree D.M.P.M.H., 12.02 - From Metal“Organic Precursors to Functional Ceramics and Related Nanoscale Materials. In: *Comprehensive Organometallic Chemistry III* Elsevier, Oxford, . **2007**, 35-70.

[192] Brinker C.J., Hydrolysis and condensation of silicates: Effects on structure. *Journal of Non-Crystalline Solids*. **1998**, 100, 31-50.

[193] Brinker C.J., Scherer G.W., *Sol-Gel Science, The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Academic Press Inc.: New York, NY, USA.**1990**

[194] Livage J., Henry M., Sanchez C., Sol-gel chemistry of transition metal oxides. *Progress in Solid State Chemistry*, **1998**, 18, 259-341.

[195] Chandradass, J, Balasubramanian, Sol-gel processing of alumina fibres. *Journal of Materials Processing Technology*, **2006**, 173, 275-280.

- [196] Crayston J.A., Meyer J.A.M.J., 1.40 - Sol-Gel. In: Comprehensive Coordination Chemistry II Pergamon, Oxford, **2003**, 711-730.
- [197] Wright J.D., Sommerdijk N.A.J.M., Sol-Gel Materials Chemistry and Applications . Advanced Chemistry Texts, CRS PRESS 4, **2001**.
- [198] Caraba R.M., Masters S.G., Eriksen K.M., Pârvulescu V.I., Fehrmann R., Selective catalytic reduction of NO by NH₃ over high surface area vanadia-silica catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, **2001**, 34, 191-200.
- [199] Celik E., Keskin I., Kayatekin I., Ak Azem F., Özkan E., Al₂O₃-TiO₂ thin films on glass substrate by sol-gel technique. *Materials Characterization*, **2007**, 58, 349-357.
- [200] Rella R., Siciliano P., Capone S., Epifani M., Vasanelli L., Licciulli A., Air quality monitoring by means of sol-gel integrated tin oxide thin films. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **1999**, 58, 283-288.
- [201] Caruso R.A., Antonietti M., Sol-Gel Nanocoating: An Approach to the Preparation of Structured Materials. *Chem. Mater.*, **2001**, 13, 3272-3282.
- [202] Chen H., Gu J., Shi J., Liu Z., Gao J., Ruan M., Yan D., A Composite Surfactant Route for the Synthesis of Thermally Stable and Hierarchically Porous Zirconia with a Nanocrystallized Framework. *Advanced Materials*, **2005**, 17, 2010-2014.
- [203] Yuan Z-Y, Ren T-Z, Su B-L, Hierarchically Mesoporous Titania Materials with an Unusual Interior Macroporous Structure. *Advanced Materials*, **2003**, 15, 1462-1465.
- [204] Zhang Y., Liang H., Zhao C., Liu Y., Macroporous alumina monoliths prepared by filling polymer foams with alumina hydrosols. *Journal of Materials Science*, **2009**, 44, 931-938.

- [205] Carbajo M.C., Lopez C., Gomez A., Enciso E., Torralvo M.J. Micro/nano-structural properties of imprinted macroporous titania and zirconia. *Journal of Materials Chemistry*, **2003**, 13, 2311-2316.
- [206] Grosso D., de A.A. Soler-Illia G.J., Crepaldi E.L., Charleux B., Sanchez C. Nanocrystalline Transition-Metal Oxide Spheres with Controlled Multi-Scale Porosity. *Advanced Functional Materials*, **2003**, 13, 37-42.
- [207] Nishihara H., Mukai S.R., Fujii Y., Tago T., Masuda T., Tamon H., Preparation of monolithic SiO₂-Al₂O₃ cryogels with inter-connected macropores through ice templating. *Journal of Materials Chemistry*, **2006**, 16, 3231-3236.
- [208] Deng W., Toepke M.W., Shanks B.H., Surfactant-Assisted Synthesis of Alumina with Hierarchical Nanopores. *Advanced Functional Materials*, **2003**, 13, 61-65.
- [209] Holland B.T., Blanford C.F., A.Stein, Synthesis of macroporous minerals with highly ordered three-dimensional arrays of spheroidal voids. *Science*, **1998**, 281, 538-540.
- [210] Su S., Chen B., He M., Hu B., Graphene oxide-silica composite coating hollow fiber solid phase microextraction online coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of trace heavy metals in environmental water samples. *Talanta*, **2014**, 123, 1-9.
- [211] Manríquez M.E., López T., Gómez R., Navarrete J., Preparation of TiO₂-ZrO₂ mixed oxides with controlled acid-basic properties. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2004**, 220, 229-237.
- [212] Θ. Π.Χατζηϊωάννου ΜΑΚ, (Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών, 2000), 'Ενόργανη Ανάλυση':377-388.
- [213] Skoog, Holler, Nieman (2002) Εκδόσεις Κωσταράκης:785-841

- [214] Lord H., Pawliszyn J., Evolution of solid-phase microextraction technology, *Journal of Chromatography A*, **2000**, 885, 153-193.
- [215] Arthur C.L., Pawliszyn J., Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, **1990**, 62, 2145-2148.
- [216] Jönsson, J. Å., Mathiasson, L., Membrane extraction in analytical chemistry. *Journal of Separation Science*, **2001**, 24, 495-507.
- [217] Gill, B. D., & Indyk, H. E.. Development and application of a liquid chromatographic method for analysis of nucleotides and nucleosides in milk and infant formulas. *International Dairy Journal*, **2007**, 17, 596-605
- [218] Viñas P., Campillo N., López-García I., Martínez-López S., Vasallo I., Hernandez-Córdoba M., Anion exchange liquid chromatography for the determination of nucleotides in baby and/or functional foods. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 7245–7249.
- [219] Inoue K., Obara R., Hino T., Oka H., Development and application of an HILIC-MS/MS method for the quantitation of nucleotides in infant formula. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 9918–9924.
- [220] Havlicek J., Samuelson O., Separation of Oligosaccharides by Partition Chromatography on Ion Exchange Resins. *Anal.Chem.*, **1975**, 47, 11, 1854-1857.
- [221] Lampert B., Stewart J., Determination of cocaine and selected metabolites in canine and human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography on coupled cyanopropyl and silica columns. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **1989**, 495, 153-165.
- [222] Rabel F.M., Caputo A.G., Butts E.T., Separation of carbohydrates on a new polar bonded phase material. *J. Chromatogr.*, **1976**, 126, 731-740.

- [223] Bisceglia K., Roberts A.L., Schantz M., Lippa K., Quantification of drugs of abuse in municipal wastewater via SPE and direct injection liquid chromatography mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 398, 2701-2712.
- [224] Shi Z.G., Wu Y.B., Luo Y.B, Feng Y.Q., Analysis of pterins in urine by HILIC. *Chromatographia*, **2010**, 71, 761-768.
- [225] Mauko L., Nordborg A., Hutchinson J.P., Lacher N.A., Hilder E.F., Haddad P.R., Glycan profiling of monoclonal antibodies using zwitterionic-type hydrophilic interaction chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry detection. *Anal. Biochem*, **2011**, 408, 235.
- [226] Liu Q., Xu L., Ke Y., Jin Y., Zhang F., Liang X., Analysis of cephalosporins by hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2011**, 54, 623-628.
- [227] Heinig K., Wirz T., Gajate-Perez A., Belli S., Determination of Ganciclovir and its prodrug Valganciclovir by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879, 436-442.
- [228] Wood T E, Dislich H , An abbreviated history of sol±gel technology. *Am. Ceram. Soc., Ceram. Trans*, **1995** 55, 3-23.
- [229] Pawliszyn J., Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice. Wiley-VCH, **1997**, New York.
- [230] Ross C, Pawliszyn J, Extraction/ Solid-Phase Microextraction. **2005**, P.W.T. Poole, in Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition), Elsevier, Oxford, , 608-616.
- [231]. Chaozhang H., Bin H., Synthesis and characterization of titania hollow fiber and its application to the microextraction of trace metals, **2011**, *Analyst*, 136, 1425-1432.

- [232] Li J., Wang L., Hao Y., Liu X., Sun X., Preparation and characterization of Al₂O₃ hollow fiber membranes. *Journal of Membrane Science*, **2005**, 256, 1-6.
- [233] Zhan S. H., Chen D. R., Jiao X. L. , Tao C. H., Long TiO₂ hollow fibers with mesoporous walls: sol-gel combined electrospun fabrication and photocatalytic properties. *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110, 11199-11204.
- [234] Xiaoyao T., Shaomin L., Li K., Preparation and characterization of inorganic hollow fiber membranes. *Journal of Membrane Science*, **2001**, 188, 87-95.
- [235] Jia L., Huan-Yang Q., Yan-Ping S., Applications of titania and zirconia hollow fibers in sorptive microextraction of N,N-dimethylacetamide from water sample. *Analytica Chimica Acta*, **2009**, 651, 182-187.
- [236] Jia L., Huan-Yang Q., Yan-Ping S., Determination of melamine residues in milk products by zirconia hollow fiber sorptive microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2009**, 1216, 5467-5471.
- [237] Kobayashi S., Hanabusa K., Hamasaki N., Kimura M., Shirai H., Shinkai S., Preparation of TiO₂ Hollow-Fibers Using Supramolecular Assemblies. *Chemistry of Materials*, **2000**, 12, 1523-1525.
- [238] Cui C., He M., Hu B., Membrane solid phase microextraction with alumina hollow fiber on line coupled with ICP-OES for the determination of trace copper, manganese and nickel in environmental water samples. *Journal of Hazardous Materials*, **2011**, 187, 379-385.
- [239] Peters T.A., Fontalvo J., Vorstman M.A.G., Benes N.E., Dam R.A.v., Vroon Z.A.E.P., Soest-Vercammen E.L.J.v., Keurentjes J.T.F., Hollow fibre microporous silica membranes for gas separation and pervaporation: Synthesis, performance and stability. *Journal of Membrane Science*, **2005**, 248, 73-80.

- [240] Hamd W., Wu Y.C., Boulle A., Thune E., Guinebretière R., Microstructural study of SnO₂ thin layers deposited on sapphire by sol–gel dip-coating. *Thin Solid Films*, **2009**, 518, 1–5.
- [241] Xu L., Lee H.K., Zirconia hollow fiber: Preparation, characterization, and microextraction application, *Analytical Chemistry*, **2007**, 79, 5241-5248.
- [242] Zhang J, Wang S., Wang Y., Xu M., Xia H., Zhang S., Huang W., Guo X, Wu S., Facile synthesis of highly ethanol-sensitive SnO₂ nanoparticles. *Sensors and actuators B: Chemical*, **2009**, 139, 369-374.
- [243] Deng D., Tang R., Liao X., Shi B., Using Collagen Fiber as a Template to Synthesize Hierarchical Mesoporous Alumina Fiber, *Langmuir*, 2007, 24, 368-370.
- [244] Liu S., Li K., Hughes R., Preparation of porous aluminium oxide (Al₂O₃) hollow fibre membranes by a combined phase-inversion and sintering method. *Ceramics International*, **2003**, 29, 875-881.
- [245] Fan T., Sun B., Gu J., Zhang D., Lau L.W.M., Biomorphic Al₂O₃ fibers synthesized using cotton as bio-templates. *Scripta Materialia*, **2003**, 53, 893-897.
- [246] Zhou L., Guo Y., Yagi M., Sakurai M., Kameyama H., Investigation of a novel porous anodic alumina plate for methane steam reforming: Hydrothermal stability, electrical heating possibility and reforming reactivity. *International Journal of Hydrogen Energy*, **2009**, 34, 844-858.
- [247] Pang Y. T., Meng G. W., Zhang L.D, Shan W.J., Gao X. Y., Zhao A. W., Mao Y.Q. Arrays of ordered Pb nanowires with different diameters in different areas embedded in one piece of anodic alumina membrane. *J. Phys.: Condens. Matter*, **2002**, 14, 11729-11736.
- [248] Tan X., Shaomin L., Li K., Preparation and characterization of inorganic hollow fiber membranes. *Journal of Membrane Science*, **2001**, 188, 87–95.

- [249] Bae C., Yoo H., Kim S., Lee K., Kim J., Sung M.M., Shin H., Template-directed synthesis of oxide nanotubes: Fabrication, characterization, and applications. *Chemistry of Materials*, **2008**, 20, 756-767.
- [250] Borgo C.A., Gushikem Y., Zirconium phosphate dispersed on a cellulose fiber surface: Preparation, characterization, and selective adsorption of Li⁺, Na⁺, and K⁺ from aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2002, 246,343-347.
- [251] Rao C. N. R., Satishkumar B. C., Govindaraj A., Hollow nanotubes of zirconia as well as of yttria-stabilized zirconia are successfully prepared by first coating the carbon nanotubes appropriately with the oxidic material and then burning off the carbon of the template. *Chemical Communications* ,**1997**, 1581.
- [252] Mineshinge A., Inaba M., Ogumi Z., Takahashi T., Kawagoe T., Tasaka A., Kikuchi K.. Preparation of hollow YSZ fibre by electrochemical vapour deposition. *Solid State Ionics*. **1996**, 86-88, Part 2. 1251-1254.
- [253] Hou S., Harrell C.C., Trofin L., Kohli P., Martin C.R., Layer-by-layer nanotube template synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, **2004**, 126, 5674-5675.
- [254] Shaomin L., Lib K., Hughesc R., Preparation of porous aluminium oxide (Al₂O₃) hollow fibre membranes by a combined phase-inversion and sintering method. *Ceramics International*, **2003**, 29, 875–881.
- [255] Randon, J.; Blanc, P., Paterson, R., Modification of ceramic membrane surfaces using phosphoric acid and alkyl phosphonic acids and its effects on ultrafiltration of BSA protein. *J. Membr. Sci*, **1995**, 98, 119-129.
- [256] Guerrero G.; Mutin P. H.; Vioux A., Anchoring of phosphonate and phosphinate coupling molecules on titania particles. *Chem. Mater.*, **2001**, 13, 4367-4373.
- [257] Sun L., Carr P. W, Mixed-mode retention of peptides on phosphate-modified polybutadiene coated zirconia. *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 2517-2523.

- [258] Kanaujia P.K., PardasaniD, Tak V., Purohit A. K., Dubey D.K., Selective enrichment of the degradation products of organophosphorus nerve agents by zirconia based solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, **1218** (2011) 6612–6620.
- [259] Schafer W. A, Carr P. W, Physical and chemical characterization of a porous phosphate-modified zirconia substrate. *Journal of Chromatography*, **1991**, 587, 137-147.
- [260] Schafer W. A, Carr P. W , Chromatographic characterization of a phosphate modified zirconia support for bio-chromatographic applications. *Journal of Chromatography*, **1991**, 587, 149-160.
- [261] Konishi J., Fujita K., Nakanishi K., Hirao K., Morisato K., Miyazaki S., Ohira M., Sol–gel synthesis of macro–mesoporous titania monoliths and their applications to chromatographic separation media for organophosphate compounds. *Journal of Chromatography A*, **2009**, 1216, 7375-7383.
- [262] Matsuda H., Nakamura H., Nakajim T. New Ceramic Titania: Selective Adsorbent for Organic Phosphates. *Analytical sciences*, **1990**, 6, 911-912.
- [263] Luschtinetz R., Oliveira A. F., Frenzel J., Joswig J.-O., Seifert G., Duarte H. A., Adsorption of phosphonic and ethylphosphonic acid on aluminum oxide surfaces. *Surface Science*, **2008**, 602, 1347–1359.
- [264] González A., Preinerstorfer B., Lindner W., Selective enrichment of phosphatidylcholines from food and biological matrices using metal oxides as solid-phase extraction materials prior to analysis by HPLC–ESI-MS/MS *Anal Bioanal Chem*, **2010**, 396, 2965–2975.
- [265] Huihui W., Jingyu Y., Long Y., Xiuli Z., Xingya X., Xiuling L., Xinmiao L., Zirconia layer coated mesoporous silica microspheres used for highly specific phosphopeptide enrichment. *Talanta*, **2010**, 82, 1701-1707.

- [266] Du D., Ye X., Zhang J., Zeng Y., Tu H, Zhang A, Liu D Stripping voltammetric analysis of organophosphate pesticides based on solid-phase extraction at zirconia nanoparticles modified electrode. *Electrochemistry Communications*, **2008**, 10, 686-690.
- [267] Liu G., Wang J., Barry R., Petersen C., Timchalk C., Gassman P.L., Lin Y., Nanoparticle-based electrochemical immunosensor for the detection of phosphorylated acetylcholinesterase: An exposure biomarker of organophosphate pesticides and nerve agents. *Chemistry - A European Journal*, **2008**, 14, 9951-9959.
- [268] Pawsey, S.; Yach, K.; Reven, L., Self-assembly of carboxyalkylphosphonic acids on metal oxide powders. *Langmuir*, **2002**, 18, 5205-5212.
- [269] Brodard-Severac F., Guerrero G., Maquet J., Florian P., Gervais C., Mutin P.H. High-Field 17O MAS NMR Investigation of Phosphonic Acid Monolayers on Titania. *Chem. Mater.*, **2008**, 20, 5191–5196.
- [270] Lafont U., Simonin L., Gaberscek M., Kelder E.M., Carbon coating via an alkyl phosphonic acid grafting route: Application on TiO₂. *Journal of Power Sources*, **2007**, 174, 1104–1108
- [271] Guerrero G., Mutin P.H., Vioux. J. A., Organically modified aluminas by grafting and sol–gel processes involving phosphonate derivatives. *Mater. Chem.*, **2001**, 11, 3161-3165.
- [272] Hector L.G., Opalka S.M., Nitowski G.A., Wieserman L., Siegel D.J., Yu H., Adams J.B., Investigation of vinyl phosphonic acid/hydroxylated α -Al₂O₃(0001) reaction enthalpies. *Surf. Sci.*, **2001**, 494, 1-20. 1-20.
- [273] Pawsey S., McCormick M., De Paul S., Graf R., Lee Y.S., Reven L., Spiess H.W., ¹H Fast MAS NMR Studies of Hydrogen-Bonding Interactions in Self-Assembled Monolayers. *Journal of the American Chemical Society*. **2003**, 125, 4171-4184.

- [274] Luschtinetz R., Oliveira A., Duarte H., A. Seifert G., Self-assembled monolayers of alkylphosphonic acids on aluminum oxide surfaces –A theoretical study. *Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie*, **2011**, 638, 1506-1512.
- [275] Luschtinetz R., Frenzel J., Milek T., Seifert. G. J., Adsorption of Phosphonic Acid at the TiO₂ Anatase (101) and Rutile (110). *Surfaces Phys. Chem. C*, **2009**, 113, 5730–5740.
- [276] Nilsing M.; Lunell S.; Persson P.; Ojamäe L., Phosphonic acid adsorption at the TiO₂ anatase (101) surface investigated by periodic hybrid HF-DFT computations. *Surf. Sci.*, **2005**, 582, 49-60.
- [277] Chandradass J., Balasubramanian M., Sol–gel processing of alumina fibres. *Journal of Materials Processing Technology*, **2006**, 173, 275–280.
- [278] Jia Li, Huan-Yang Qi, Yan-Ping Shi, Applications of titania and zirconia hollow fibers in sorptive microextraction of N,N-dimethylacetamide from water sample. *Analytica Chimica Acta*, **2009**, 651, 182–187.
- [279] Manríquez M.E., López T., Gómez R, Navarrete J., Preparation of TiO₂–ZrO₂ mixed oxides with controlled acid–basic properties. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2004**, 220, 229–237.
- [280] Torres Martinez D.Y., Castanedo Perez R., Torres Delgado G., Zelaya Angel O., Structural, morphological, optical and photocatalytic characterization of ZnO–SnO₂ thin films prepared by the sol-gel technique. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2012**, 235, 49– 55.
- [281] R.S.A. de Lange, J.H.A. Hekkink, K. Keizer, A.J. Burggraaf, Formation and characterization of supported microporous ceramic membranes prepared by sol-gel modification techniques. *Journal of Membrane Science*, **1995**, 99, 57-75.

- [282] Young-Soo Jung, Dong-Woo Kim, Young-Soo Kim, Eun-Kyung Park, Sung-Hyeon Baeck Synthesis of alumina–titania solid solution by sol–gel method. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, **2008**, 69 1464–1467.
- [283] A. Boumaza, L. Favaro, J. Lédion, G. Sattonnay, J.B. Brubach, P. Berthet, A.M. Huntz, P. Roy, R. Tétot, Transition alumina phases induced by heat treatment of boehmite: An X-ray diffraction and infrared spectroscopy study. *Journal of Solid State Chemistry*, **2009**, 182, 1171–1176.
- [284] Guang Li, Sun, X., Synthesis and sintering behavior of a nanocrystalline α -alumina powder., *Acta mater*, **2000**, 48, 3103–3112.
- [285] Jie-Hua Wu, Bao-Shun Li, Jing-Kun Guo, A novel wet chemistry two-step calcining process for the synthesis of ultrafine α - Al_2O_3 particles. *Materials Letters*, **2001**, 47, 40–43.
- [286] Kiranmala Laishram, Rekha Mann, Neelam Malhan, A novel microwave combustion approach for single step synthesis of α - Al_2O_3 nanopowders. *Ceramics International*, **2012**, 38, 1703–1706.
- [287] Erdal C,elik, Preparation and characterization of Al_2O_3 – TiO_2 powders by chemical synthesis for plasma spray coatings. *Journal of Materials Processing Technology*, **2002**, 128, 205–209.
- [288] A. Boumaza, L. Favaro, J. Lédion, G. Sattonnay, J.B. Brubach, P. Berthet, A.M. Huntz, P. Roy, R. Tétot, Transition alumina phases induced by heat treatment of boehmite: An X-ray diffraction and infrared spectroscopy study, *Journal of Solid State Chemistry*, **2009**, 182, 1171–1176.
- [289] S. Cava, S.M. Tebcherani, I.A. Souza, S.A. Pianaro, C.A. Paskocimas, E. Longo, J.A. Varela, Structural characterization of phase transition of Al_2O_3 nanopowders obtained by polymeric precursor method, *Materials Chemistry and Physics*, **2007**, 103, 394–399.

- [290] Chaozhang Huang and Bin Hu Synthesis and characterization of titania hollow fiber and its application to the microextraction of trace metals. *Analyst*, **2011**, 136, 1425.
- [291] G. Colón, M.C. Hidalgo, J.A. Navío, Effect of ZrO_2 incorporation and calcination temperature on the photocatalytic activity of commercial TiO_2 for salicylic acid and Cr(VI) photodegradation. *Applied Catalysis A: General*, **2002**, 231, 185–199.
- [292] Muhammad Nasir Khan, Javaid Bashir, Small Angle Neutron Scattering and X-Ray Diffraction Studies of Nanocrystalline Titanium Dioxide. *Journal of Modern Physics*, **2011**, 2, 962-965.
- [293] L. Xu, H.K. Lee, Zirconia Hollow Fiber: Preparation, Characterization, and Microextraction Application. *Analytical Chemistry*, **2007**, 79, 5241-5248.
- [294] V. Santos, M. Zeni, C.P. Bergmann and J.M. Hohemberger, Correlation between thermal treatment and tetragonal/monoclinic nanostructured zirconia powder obtained by sol-gel process. *Rev.Adv.Mater.Sci*, **2008**, 17, 62-70.
- [295] Lee S. H., Jamison A.C., Hoffman D. M., Jacobson A. J., Lee T. R., Preparation and characterization of polymeric thin films containing gold nanoshells via electrostatic layer-by-layer self-assembly. *Thin Solid Films*, **2014**, 558, 200–207.
- [296] A.R. Babar, S.S. Shindea, A.V. Moholkar, K.Y. Rajpurea, Electrical and dielectric properties of co-precipitated nanocrystalline tin oxide. *Journal of Alloys and Compounds*, **2010**, 505, 743–749.
- [297] Madzlan Aziz, Saad Saber Abbas, Wan Rosemaria Wan Baharom, Wan Zuraidah Wan Mahmud, Structure of SnO_2 nanoparticles by sol–gel method. *Materials Letters*, **2012**, 74, 62–64.

- [298] Madzlan Aziz, Saad Saber Abbas, Wan Rosemaria Wan Baharom, Size-controlled synthesis of SnO₂ nanoparticles by sol–gel method. *Materials Letters*, **2013**, 91, 31–34.
- [299] B. Benrabah, A. Bouaza, A. Kadari, M.A. Maaref, Impedance studies of Sb doped SnO₂ thin film prepared by sol gel process. *Superlattices and microstructures*, **2011**, 50, 591–600.
- [300] A.R. Babara, S.S. Shindea, A.V. Moholkarb, K.Y. Rajpurea, Electrical and dielectric properties of co-precipitated nanocrystalline tin oxide. *Journal of Alloys and Compounds*, **2010**, 505, 743–749.
- [301] Z.K. Heibaa, M.A. Ahmed, Sameh I. Ahmed, Structural investigations of nanomixed oxides SnO₂-xAl₂O₃ prepared by sol-gel technique. *Journal of Alloys and Compounds*, **2010**, 507, 253–256.
- [302] Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A., (Eds), Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης, 5η έκδοση, Κωσταράκης Α.Ε., Αθήνα, **2002**, 793.
- [303] Guo Y., Gaiki S., Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr.A*, **2005**, 1074, 71-80.
- [304] McCalley D.V., Neue U.D., Estimation of the extent of the water-rich layer associated with the silica surface in hydrophilic interaction chromatography. *J.Chromatogr,A*, **2008**, 1192, 225-229.
- [305] Horie K., Ikegami T., Hosoya K., Saad N., Fiehn O., Tanaka N., Highly efficient monolithic silica capillary columns modified with poly(acrylic acid) for hydrophilic interaction chromatography. *J.Chromatogr.A*, **2007**, 1164, 198-205.
- [306] Kazakevich Y., LoBrutto R. (Eds), HPLC for pharmaceutical scientists, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA, **2007**, 171-191, 206-217, 381, 804-806.

- [307] Gagliardi L.G., Castells C.B., Ráfols C., Rosés M., Bosch E., Conversion Parameter between pH scales (sw pH and sspH) in acetonitrile/water mixtures at various compositions and temperatures. *Anal.chem.*, **2007**, 79, 3180-3187.
- [308] Ganguly, S, Kundu, K. K, . Deprotonation energetics of adenine, adenosine, 5-adenosine monophosphate and adenosine triphosphate in water from EMF and spectrophotometric measurements. *Journal of Solution Chemistry*, **1994**, 23. 11, 1227-1246.
- [309] Dolan J.W., Snyder L.R. (Eds), Troubleshooting LC systems: A comprehensive approach to troubleshooting LC equipment and separations. *Human Press*, Totowa, New Jersey, **1989**, 401-411.
- [310] Li R., Huang J., Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography. *J.Chromatogr.A.*, **2004**, **1041**, 163-169.
- [311] Zhigang Hao, Baiming Xiao, Naidong Weng, Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 1449-1464.
- [312] R. Kucêra, P. Kováříková, M. Klivický, J. Klimês, The retention behaviour of polar compounds on zirconia based stationary phases under hydrophilic interaction liquid chromatography conditions. *Journal of Chromatography A*, **2011**, 1218, 6981–6986.
- [313] Tarık Aral, Hayriye Aral, Berrin Ziyadanoğullari, Recep Ziyadanoğulla,, Synthesis of a mixed-model stationary phase derived from glutamine for HPLC separation of structurally different biologically active compounds: HILIC and reversed-phase applications. *Talanta*, **2015**, 131, 64–73.
- [314] Lili Dong, Junxiong Huang, Effect of Temperature on the Chromatographic Behavior of Epirubicin and its Analogues on High Purity Silica Using Reversed-Phase Solvents. *Chromatographia*, **2007**, 65, 519–526.

- [315] Y. Guo., S. Srinivasan, S. Gaiki, Investigating the effect of chromatographic conditions on retention of organic acids in hydrophilic interaction chromatography using a design of experiment. *Chromatographia*, **2007**, 66, 223–229.
- [316] Matthew J. Christopherson, Kenton J. Yoder, Jason T. Hill, Hydrophilic interaction liquid chromatographic (HILIC)/Ion exchange separation of picolinic and nicotinic acids. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2006**, 29, 2545–2558.
- [317] Tadashi Nishioa, Eri Ayanoa, Yusuke Suzukia, Hideko Kanazawaa, Teruo Okano, Separation of phosphorylated peptides utilizing dual pH and temperature-responsive chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2011**, 1218, 2079–2084.
- [318] Paglia G., D'Apolito O., Tricarico F., Garofalo D., Corso G., Evaluation of mobile phase, ion pairing, and temperature influence on an HILIC-MS/MS method for L-arginine and its dimethylated derivatives detection. *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 2424 – 2429.
- [319] Haoa Z., Lub C.-Y., Xiao B., Weng N., Parker B., Knappa M., Hob C.-T., Separation of amino acids, peptides and corresponding Amadori compounds on a silica column at elevated temperature. *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1147 165–171.
- [320] Kanazawa H., Okanob T., Temperature-responsive chromatography for the separation of biomolecules. *Journal of Chromatography A*, **2011**, 1218, 8738-8747.
- [321] Modig K., Pfrommer B.G., Halle B., Temperature dependent hydrogen bond geometry in liquid water. *Physical Review Letters*, **2003**, 90, 075502.
- [322] Melander W.Campell D.V., Horváth C., Enthalpy-entropy compensation in reversed- phase chromatography. *Jounral of Chromatography*, **1978**, 158, 215-225.
- [323] Poole C.F. (Ed), The essence of chromatography. *Elsevier*, **2003**, 19-23, 349-359.

- [324] Quiming N.S., Denola N.L., Saito Y., Catabay A.P., Jinno K., Chromatographic behavior of uric acid and methyl uric acids on a diol column in HILIC. *Chromatographia*, **2008**, 67, 507-515.
- [325] Scott P.R.W. (Ed), The thermodynamics of Chromatography. Chrom-Ed Book Series, *LIBRARY4SCIENCE, LLC*, **2003**, 1-12.
- [326] Wu J.Y., Bicker W., Linder W., Separation properties of novel and commercial polar stationary phases in hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography mode., *J. Sep.Sci.*, **2008**, 31, 1492-1503.
- [327] Johnsen E., Wilsona S.R., Odsbub I., Krapp A., Maleroda H., Skarstad K., Lundanesa E., Hydrophilic interaction chromatography of nucleoside triphosphates with temperature as a separation parameter. *Journal of Chromatography A*, **2011**, 1218, 5981-5986.
- [328] Yang X., Castleman A. W., Temperature and cluster size dependence studies of reactions of protonated water clusters with acetonitrile. *J. Chem. Phys.*, **1991**, 95, 130-134.
- [329] Guo Y., Huang A., A HILIC method for the analysis of tromethamine as the counter ion in an investigational pharmaceutical salt. *J.Pharm.Biomed.Anal.*, **2003**, 31, 1191-1201.
- [330] Appelblad P., Abrahamsson P., MS Detection of homocysteine, methylmalonic acid and succinic acid using HILIC liquid chromatographic separation on a covalently bonded zwitterionic stationary phase. *LC GC*, **2005**, 24-25.
- [331] Arya S. S. and Parihar D. B., Changes in free nucleotides, nucleosides and bases during thermal processing of goat and sheep meats Part I. Effect of temperature, *Die Nahrung*, **1979**, 23, 1, 1-7.

- [332] Koichi Inoue, Rutsuko Obara, Tomoaki Hino, Hisao Oka, Development and Application of an HILIC-MS/MS Method for the Quantitation of Nucleotides in Infant Formula. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58, 9918–9924.
- [333] Nawrocki J., Rigney M., McCormick A., Carr P. W., Chemistry of zirconia and its use in chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1993**, 657, 229-282.
- [334] Heiba, Z. K., Ahmed, M. A., Ahmed, S. I., Structural investigations of nanomixed oxides $\text{SnO}_2\text{-xAl}_2\text{O}_3$ prepared by sol–gel technique. *Journal of Alloys and Compounds*, **2010**, 507, 253–256.
- [335] Jayalakshmi M., Venugopal N., Raja, K. P., Rao M. M., Nano $\text{SnO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ mixed oxide and $\text{SnO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-carbon}$ composite oxides as new and novel electrodes for supercapacitor applications. *Journal of Power Sources*, **2006**, 158, 1538-1543.
- [336] Kirszensztejn P., Szymkowiak A., Marciniak P., Martyla A., Przekop R., Texture of $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-SnO}_2$ binary oxides system obtained via sol–gel chemistry. *Applied Catalysis A: General*, 2003, 245, 159–166.
- [337] Turek A.K., Dzido T.H., Engelhardt H., The effect of modifier on selectivity in reversed-phase high performance liquid chromatography, *LC GC Europe*, Jan 1, **2008**.
- [338] Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography. *J.Chromatogr. A*, **2004**, 1041, 163-169.
- [339] Arya S. S., Parihar D. B., Changes in free nucleotides, nucleosides and bases during thermal processing of goat and sheep meats. Part I. Effect of temperature. *Die Nahrung*, **1979**, 23, 1-7.
- [340] Huang C., Hu B., Synthesis and characterization of titania hollow fiber and its application to the microextraction of trace metals. *Analyst*, **2011**, 136, 1425-1432.
- [341] Lakshmi B.L., Dorhout P.K., Martin C. R., Sol–gel template synthesis of semiconductor nanostructures. *Chem. Mater.*, **1997**, 9 (3), 857–862.

[342] Li J., Qi H.-Y., Shi Y.-P., Applications of titania and zirconia hollow fibers in sorptive microextraction of N,N-dimethylacetamide from water sample. *Analytica Chimica Acta*, **2009**, 651, 182–187.

[343] Habibpanah A. A., Pourhashem S., Sarpoolaky H., Preparation and characterization of photocatalytic titania–alumina composite membranes by sol–gel methods. *Journal of the European Ceramic Society*, **2011**, 31, 2867–2875.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα κεραμικά υλικά, όπως η ζirkονία, η τιτανία κλπ είναι ισχυρά οξέα κατά Lewis και μπορούν να αλληλεπιδρούν με βάσεις κατά Lewis, όπως οι φωσφονικές ομάδες οργανοφωσφορικών ενώσεων. Συνεπώς, τα οξείδια αυτά μπορεί να αποτελέσουν κατάλληλα υλικά για τον καθαρισμό (clean-up), τη μικροεκχύλιση-προσυγκέντρωση νουκλεοτιδίων από βρεφικά γάλατα (μητρικά και εμπορίου) και επιλεγμένων φυτοφαρμάκων που περιέχουν φωσφονικές ομάδες από υδατικά περιβαλλοντικά δείγματα.

Στην παρούσα μελέτη προτείνεται η κατασκευή κοίλων κεραμικών ινών αλουμίνας, τιτανίας, ζirkονίας, σταννίας, πυριτίας και οι σύνθετες ίνες αλουμίνας-τιτανίας, τιτανίας-ζirkονίας με τη μέθοδο sol-gel. Για τη σύνθεση των ινών, πρωταρχικό ρόλο παίζει η σύνθεση των υδρολυμάτων (sol), τα οποία στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για την επικάλυψη της πολυμερικής ίνας και τη σύνθεση των αντίστοιχων κεραμικών υλικών. Οι κοίλες ίνες που παρασκευάζονται, χαρακτηρίζονται με φασματοσκοπία διασποράς ενέργειας ακτίνων-X, με περίθλαση ακτίνων-X και μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων.

Στη συνέχεια, προτείνεται μία μέθοδος προσδιορισμού μονοφωσφορικών νουκλεοτιδίων σε μητρικά γάλατα και εμπορικά βρεφικά γάλατα με υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης και ανιχνευτή συστοιχίας διόδων. Τα νουκλεοτίδια είναι υδρόφιλα, μη πτητικά και μπορούν να προσδιοριστούν με τη HILIC. Η τεχνική αυτή προϋποθέτει υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις παρουσία μίγματος υδατο-οργανικών κινητών φάσεων για την δημιουργία μιας στιβάδας νερού στην επιφάνεια της στατικής φάσης μέσα στην οποία οι αναλύτες κατανέμονται με βάση την πολικότητά τους. Ο μηχανισμός αυτός είναι πολύ αποτελεσματικός για την κατακράτηση ισχυρά πολικών ενώσεων και κατά συνέπεια και των νουκλεοτιδίων. Αποδεικνύεται, λοιπόν, ότι τα νουκλεοτίδια παρουσιάζουν τυπική συμπεριφορά υδρόφιλης αλληλεπίδρασης με μια στήλη αμιδο-πυριτίας, υπό τις βελτιστοποιημένες συνθήκες, παρουσιάζοντας ικανοποιητικό διαχωρισμό. Η επίτευξη ενός ικανοποιητικού διαχωρισμού στην HILIC περιλαμβάνει έναν συμβιβασμό μεταξύ της χρωματογραφικής απόδοσης της στήλης (k' , T_R , R_s) και του συνολικού χρόνου ανάλυσης. Επίσης, λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεων των νουκλεοτιδίων στα γάλατα, είναι απαραίτητη η προσυγκέντρωσή τους επάνω στις κεραμικές ίνες, οι

οποίες, όπως προαναφέρθηκε, παρουσιάζουν χημική συγγένεια με τα νουκλεοτίδια με αποτέλεσμα να μπορούν, σε κατάλληλες συνθήκες, να τα προσυγκεντρώνουν. Χρησιμοποιούνται οι κεραμικές κοίλες ίνες της αλουμίνας και της σταννίας και εξυπηρετούν με διττό τρόπο την ανάλυση αφού χρησιμοποιούνται τόσο για τον καθαρισμό του δείγματος όσο ταυτόχρονα και την προσυγκέντρωση.

Τέλος, προτείνεται μία μέθοδος προσδιορισμού επιλεγμένων φυτοφαρμάκων που διαθέτουν στο μόριό τους φωσφονικές ομάδες, όπως τα glyphosate και glufosinate σε περιβαλλοντικά νερά με αέρια χρωματογραφία και ανιχνευτή φασματομετρία μάζας. Τα συγκεκριμένα φυτοφάρμακα είναι μη πτητικά και ιδιαίτερα πολικά και υδρόφιλα και για αυτό το λόγο ο προσδιορισμός τους με αέρια χρωματογραφία απαιτεί πρώτα την παραγωγοποίησή τους. Για το σκοπό αυτό μελετάται μιας μέθοδος παραγωγοποίησης με στόχο τον καλύτερο διαχωρισμό των αναλυτών. Για την παραγωγοποίηση γίνεται χρήση δύο αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης, του ανυδρίτη του τριφθοροξικού οξέος και της 2,2,2-τριφθοροαιθανόλης. Τα αντιδραστήρια αυτά σχηματίζουν σταθερά προϊόντα και με τη χρήση τους, η παραγωγοποίηση επιτυγχάνεται σε ένα στάδιο, απλά και σχετικά γρήγορα. Λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεών τους στα επιφανειακά νερά είναι απαραίτητη η προσυγκέντρωση των φυτοφαρμάκων σε κεραμικές κοίλες ίνες και έτσι, επιτρέπεται η ποσοτικοποίησή τους σε χαμηλές συγκεντρώσεις, της τάξης των ng/L.

Summary

Alumina, titania, zirconia, stannia, silica and their composites alumina-titania, titania-zirconia are Lewis acids and can interact with Lewis bases, such as phosphonate groups in organic compounds. Hence, these oxides can exhibit selectivity to phosphonate groups of organic molecules of environmental and biological interest. Also, they are capable of being used for their microextraction and preconcentration of nucleotides, such as adenosine 5'-monophosphate and guanosine 5'-monophosphate were separated by hydrophilic interaction liquid chromatography, after preconcentration on the abovementioned materials. Moreover, phosphonic group-containing pesticides, such as glufosinate and glyphosate can be extracted on the same materials and determined by gas chromatography, after appropriate derivatization with trifluoroethanol-trifluoroacetic anhydride.

In this PhD study, the synthesis of hollow fibers based on alumina, titania, zirconia, stannia, silica, alumina-titania and titania-zirconia is put forward via sol-gel procedures, widely employed for the manufacture of such ceramic materials. A polypropylene hollow fiber membrane was used as template. The preparation procedure proceeds through repeated impregnations of the template in the proper sol precursor and subsequently calcination to burn off the template, thus producing the metal oxide hollow fibers. The synthesized fibers were characterized by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX), X-ray diffraction analysis (XRD) and scanning electron microscopy (SEM).

Nucleotides play an important role in human body and its metabolism, especially in infants. It has been reported that they are implicated in the polyunsaturated fat metabolism, significant decrease in the risk of diarrhea, immunological systems, internal microflora and differentiation of intestinal cells. The addition of nucleotides in infant formulas has been suggested to have beneficial effects on the growth and maturation of the gastrointestinal tract of healthy infants. In our study, the sample preparation involved protein removal and selective preconcentration of nucleotides on oxide fibers. Subsequently, the eluents were injected into a liquid chromatographic system equipped with a diode-array detection and separated by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). The optimum chromatographic conditions for the separation of adenosine 5'-

monophosphate, guanosine 5'-monophosphate, uridine 5'-monophosphate, cytidine 5'-monophosphate and inosine 5'-monophosphate were established. An amide-silica chromatographic column gave acceptable separation and peak shape. Isocratic elution was used with mobile phase consisting of ACN: H₂O (75:25) adjusted to pH 3.0 with HCOOH and flow rate of 1.0 ml/ min, at 20 °C. The chromatographic peaks were monitored using a diode array detector at 260-300 nm. The total analysis time was 40 min. The recoveries of spiked samples were in the range of 82- 90%.

Moreover, an increasing number of organophosphorus compounds are widely used as pesticides in the environment. Among them, glyphosate, glufosinate, bialaphos, (1-aminopropyl)phosphonic acid and (1-aminobutyl)phosphonic acid, which contain phosphonic and amino acid groups in their molecules are highly water soluble and widely used in agricultural applications. Because of their toxicity, there is a great interest and need to determine these pesticides and some of their major metabolites in environmental water samples. The determination was achieved by capillary gas chromatography-mass spectrometry after appropriate derivatization with 2,2,2-trifluoroethanol and trifluoroacetic anhydride and preconcentration on ceramic hollow fibers. The detection limits attained are in the low sub- μ g/L range and the developed method proved to be applicable to an environmental water matrix.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Πορείες σύνθεσης κεραμικών ινών

ΣΤΟΧΟΣ ΚΕΡΑΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΡΕΙΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
Αλουμίνα	• διάλυμα ισοπροποξειδίου του αργιλίου 1M • 0,07 mol HNO₃ • Υδροξύλοαιθυλοκυτταρίνη • Διάλυμα π.αμμωνίας	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και reflux στους 80 °C για 3 ώρες. Προσθήκη της κυτταρίνης, απομάκρυνση του νερού και με τη βοήθεια σύριγγας σχηματισμός ινών μέσα σε διάλυμα αμμωνίας	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Μη ανθεκτικές ίνες	[195]
Αλουμίνα	• 2,55g ισοπροποξειδίου του αργιλίου • 12,5 mL δις απεσταγμένου ύδατος • 50 μL π. HNO₃	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και reflux στους 80 °C για 3 ώρες	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Μη ανθεκτικές ίνες	Παραλλαγή του [195]
Αλουμίνα	• 2,55g ισοπροποξειδίου του αργιλίου • 12,5 mL δις απεσταγμένου ύδατος • 400 μL π. HNO₃	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και reflux στους 80 °C για 3 ώρες	ΑΠΟΔΟΧΗ ΠΟΡΕΙΑΣ Ικανοποιητική μορφή ίνας	Παραλλαγή του [195]
Τιτανία	• 2,5 mL ισοπροποξειδίου του τιτανίου • 5 mL αιθανόλης • 0,6 mL ακετυλοακετόνης • νιτρικό οξύ για pH 4	Ανάμειξη αντιδραστηρίων και προσθήκη νιτρικού οξέος έως το pH να μειωθεί στο 4	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Το sol μετατρέπεται πολύ γρήγορα σε gel.	[340]
Τιτανία	• <u>1^ο διάλυμα</u> • 0,5 mL ισοπροποξειδίου του τιτανίου • 2,5 mL αιθανόλη	Το 1 ^ο διάλυμα κατασκευάζεται σε παγόλουτρο. Το 2 ^ο διάλυμα προστίθεται	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Εύθραυστες ίνες	[341]

	<u>2^ο διάλυμα</u> • 2,5 mL αιθανόλη • 50μL δις απεσταγμένο νερό • 50μL υδροχλωρικό οξύ (0,1N).	στο 1 ^ο και το τελικό διάλυμα μεταφέρεται σε υδρόλουτρο σε θερμοκρασία 15 °C		
Τιτανία	• 1 mL ισοπροποξειδίου του τιτανίου • 4,5 mL αιθανόλη • 0,15 mL δις απεσταγμένο νερό • 0,3 mL οξικού οξέος	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και ανάδευση για 10 min	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Το sol μετατρέπεται πολύ γρήγορα σε gel.	[149]
Τιτανία	• 1 mL ισοπροποξειδίου του τιτανίου • 4,5 mL αιθανόλη • 0,3 mL οξικού οξέος	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και ανάδευση για 10 min	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Το sol μετατρέπεται σε gel.	Παραλλαγή του [149]
Τιτανία	• 1 mL ισοπροποξειδίου του τιτανίου • 4,5 mL αιθανόλη • 0,3 mL οξικού οξέος	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων σε παγόλουτρο και ανάδευση για 10 min	ΑΠΟΔΟΧΗ ΠΟΡΕΙΑΣ Ικανοποιητική μορφή ίνας	Παραλλαγή του [149]
Ζιρκονία	• 0,5 gr ένυδρο οξοχλωριούχο ζιρκόνιο • 7,5 mL αιθανόλης • 0,67 mL υπεροξειδίου του υδρογόνου	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και ανάδευση για 90 min και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε κλειστό δοχείο για 3h στους 70 °C	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Εύθραυστες ίνες	[151]
Ζιρκονία	• 0,5 gr ένυδρο οξοχλωριούχο ζιρκόνιο • 6,25 mL αιθανόλης • 3,75 mL δις απεσταγμένο νερό	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και ανάδευση για 2 ώρες στους 70 °C	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Εύθραυστες ίνες	[293]
Ζιρκονία	• 3,58mL βουτοξειδίου του ζιρκονίου • 5,5mL βουτανόλη • HNO₃, pH 3 • 60 mL δις	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και ανάδευση για 5h σε reflux στους 70 °C. Προσθήκη	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Το sol μετατρέπεται πολύ γρήγορα σε gel.	[211]

	απεσταγμένο νερό	νερού και ανάδευση		
Ζιρκονία	• 3,58mL βουτοξείδιο του ζιρκονίου • 5,5mL βουτανόλη • HNO₃, pH 3	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και ανάδευση για 5h σε reflux στους 70 °C	ΑΠΟΔΟΧΗ ΠΟΡΕΙΑΣ Ικανοποιητική μορφή ίνας	Παραλλαγή από το [211]
Σταννία	• 0,9 gr Διένυδρο χλωριούχο κασσίτερο • 40 mL αιθανόλη • 1mL π. αμμωνία	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και ανάδευση για 30 min	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Μη λήψη ινών	[242]
Σταννία	• 0,5 gr Διένυδρο χλωριούχο κασσίτερο • 80 mL H₂O	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων, ανάδευση για 2 μέρες και απόχυση υπερκείμενου	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Μη λήψη ινών	[152]
Σταννία	• 2 gr διένυδρο χλωριούχο κασσίτερο • 25 mL αιθανόλη	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και ανάδευση σε reflux στους 80 °C για 24h	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Μη λήψη ινών	[240]
Σταννία	• 2gr διένυδρο χλωριούχο κασσίτερο • 25mL αιθανόλη • Προσθήκη 1,2 mL ακετυλοακετόνη	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και ανάδευση για 30min. Ακολουθεί reflux στους 80°C για 5h	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Εύθραυστες ίνες	[298]
	• 2,25gr διένυδρο χλωριούχο κασσίτερο • 22mL αιθανόλη • 1,5μL γλυκερόλη • 192μL τριαιθυλαμίνη	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και ανάδευση για 1h. Κατασκευή ινών	ΑΠΟΔΟΧΗ ΠΟΡΕΙΑΣ Ικανοποιητική μορφή ίνας	[153]
Πυριτία	• 0,75 τετρααιθόξυ σιλάνιο • 25 mL αιθανόλη • 1,8 mL π. αμμωνία	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και ανάδευση για 30min	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Εύθραυστες ίνες	[295]
Πυριτία	• 1mL τετρααιθόξυ σιλάνιο • 3,8mL αιθανόλη • 6,4mL δις απεσταγμένο νερό	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και ανάδευση σε reflux για 3h	ΑΠΟΔΟΧΗ ΠΟΡΕΙΑΣ Ικανοποιητική μορφή ίνας	[281]

	• 0,085 mL HNO₃	και κατασκευή ινών		
Αλουμίνα-Σταννία	• 1,8gr διένυδρο χλωριούχο κασσίτερο • 1,8 gr νιτρικό αργίλιο • 5mL δις απεσταγμένο νερό • π. αμμωνία, για pH 8-9	Ανάμειξη των αντιδραστηρίων και ανάδευση για 48h	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Το sol μετατρέπεται γρήγορα σε gel.	[334]
Αλουμίνα-Σταννία	• 1,2gr διένυδρο χλωριούχο κασσίτερο • 1,9gr νιτρικό αργίλιο • 25mL δις απεσταγμένο νερό • 2,4gr ουρία	Ανάμειξη αντιδραστηρίων, κατασκευή ινών και τοποθέτηση για καύση σε αυτόκλειστο	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Μη λήψη ινών	[335]
Αλουμίνα-Σταννία	• 1,2gr διένυδρο χλωριούχο κασσίτερο • 1,9gr νιτρικό αργίλιο • 25mL αιθανόλη • 2,4gr ουρία	Ανάμειξη αντιδραστηρίων, κατασκευή ινών και τοποθέτηση για καύση σε αυτόκλειστο	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Δεν σχηματίζονται ίνες	Παραλλαγή του [335]
Αλουμίνα-Σταννία	• 1,2gr διένυδρο χλωριούχο κασσίτερο • 1,9gr νιτρικό αργίλιο • 25mL αιθανόλη • 146μL γλυκερόλη • 193μL τριαιθαμίνη	Ανάμειξη αντιδραστηρίων, ανάδευση για 1h και κατασκευή ινών	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Σχηματίζονται ίνες που αποτελούνται μόνο από σταννία	Πορεία χωρίς βιβλιογραφία
Αλουμίνα-Σταννία	<u>1ο Διάλυμα</u> • 2,55 gr Ισοπροποξειδίο του αργιλίου • 12,5 mL H₂O <u>2ο Διάλυμα</u> • 2,25gr διένυδρο χλωριούχο κασσίτερο • 22mL αιθανόλη • 1,5μL γλυκερόλη • 192μL τριαιθυλαμίνη	Ανάμειξη των δύο διαλυμάτων. Ανάδευση για 24h και κατασκευή ινών	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Σχηματίζονται ίνες που αποτελούνται μόνο από σταννία	Πορεία χωρίς βιβλιογραφία

Αλουμίνα-Σταννία	<u>1ο Διάλυμα</u> • 2,55 gr ισοπροποξειδίο του αργιλίου • 12,5 mL δις απεσταγμένο νερό <u>2ο Διάλυμα</u> • 2,25gr διένυδρο χλωριούχο κασσίτερο • 22mL αιθανόλη • 1,5μL γλυκερόλη • 192μL τριαιθυλαμίνη	Κατασκευή ινών με εμβάπτιση σε διαφορετικό sol κάθε φορά	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Σχηματίζονται ίνες που αποτελούνται μόνο από σταννία	Πορεία χωρίς βιβλιογραφία
Αλουμίνα-Σταννία	• 2,55 gr Ισοπροποξειδίο του αργιλίου • 12,5 mL δις απεσταγμένο νερό • 400μL HNO₃ 16M • 2,55gr διένυδρο χλωριούχο κασσίτερο	Ανάδευση για 2h σε reflux στους 80 °C και προσθήκη διένυδρου χλωριούχου κασσιτέρου reflux στους 80 °C για 24h. Κατασκευή ινών	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Σχηματίζονται ίνες που αποτελούνται μόνο από σταννία	Πορεία χωρίς βιβλιογραφία
Αλουμίνα-Σταννία	<u>1ο Διάλυμα</u> • 2,55 gr Ισοπροποξειδίο του αργιλίου • 12,5 mL δις απεσταγμένο νερό <u>2ο Διάλυμα</u> • 0,9 gr Διένυδρο χλωριούχο κασσίτερο • 40 mL αιθανόλη • 1mL π. αμμωνία	Ανάμειξη των δύο διαλυμάτων και ανάδευση	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Σχηματισμός πηκτής πολύ γρήγορα	Πορεία χωρίς βιβλιογραφία
Αλουμίνα-Σταννία	• 0,5 gr διένυδρο χλωριούχο κασσίτερο • 0,5 gr ισοπροποξειδίο του αργιλίου • 80 mL δις απεσταγμένο νερό	Ανάδευση για 2 ημέρες, απόχυση υπερκείμενου και κατασκευή ινών	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Μη λήψη ινών	Πορεία χωρίς βιβλιογραφία
Αλουμίνα-Σταννία	• 1gr διένυδρο χλωριούχο κασσίτερο • 1gr ισοπροποξειδίο του	Ανάδευση για 30min Προσθήκη ακετυλοακετόνης και	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Σχηματίζονται ίνες που αποτελούνται μόνο από σταννία	Πορεία χωρίς βιβλιογραφία

	αργιλίου • 25mL αιθανόλη • 1,2 mL ακετυλοακετόνη	ανάδευση για 30min και ακολουθεί reflux για 5h στους 80 °C. Κατασκευή ινών		
Αλουμίνα- τιτανία	• 1gr ισοπροποξείδιο του αργιλίου • 1 mL ισοπροποξείδιο του τιτανίου • 3mL προπανάλη • 5mL δις απεσταγμένο νερό	Ανάδευση σε reflux για 24h στους 80 °C. Ανάδευση για 24h στους 80 °C. Κατασκευή ινών.	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Εύθραυστες ίνες	[282]
Αλουμίνα- τιτανία	• 1gr ισοπροποξείδιο του αργιλίου • 1 mL ισοπροποξείδιο του τιτανίου • 3mL προπανάλη • 5mL δις απεσταγμένο νερό • HNO ₃ , pH 2	Ανάδευση σε reflux για 16h στους 80 °C. Κατασκευή ινών	ΑΠΟΔΟΧΗ ΠΟΡΕΙΑΣ Ικανοποιητική μορφή ίνας	[343]
Τιτανία- ζirkονία	• 1 mL ισοπροποξείδιο του τιτανίου • 1mL βουτοξείδιο του ζirkονίου • 3mL προπανάλη • π.αμμωνία, pH 9 • 1mL δις απεσταγμένο νερό	Ανάδευση για 5 min και αύξηση θερμοκρασίας στους 30°C. Προσθήκη δις απεσταγμένου νερού. Ηρεμία για 24h. Απόχυση υπερκείμενου. Κατασκευή ινών.	ΑΠΟΡΡΙΠΤΕΤΑΙ Εύθραυστες ίνες	[159]
Τιτανία- ζirkονία	• 1 mL ισοπροποξείδιο του τιτανίου • 1mL βουτοξείδιο του ζirkονίου • 12mL προπανάλη • HNO ₃ , pH 2	Ανάδευση σε reflux για 5h στους 70 °C. Κατασκευή ινών	ΑΠΟΔΟΧΗ ΠΟΡΕΙΑΣ Ικανοποιητική μορφή ίνας	[211]

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

Βασικοί χρωματογραφικοί όροι

Σημαντικοί όροι που αποτελούν κριτήριο μελέτης σε ένα χρωματογραφικό διαχωρισμό και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, είναι οι ακόλουθοι:

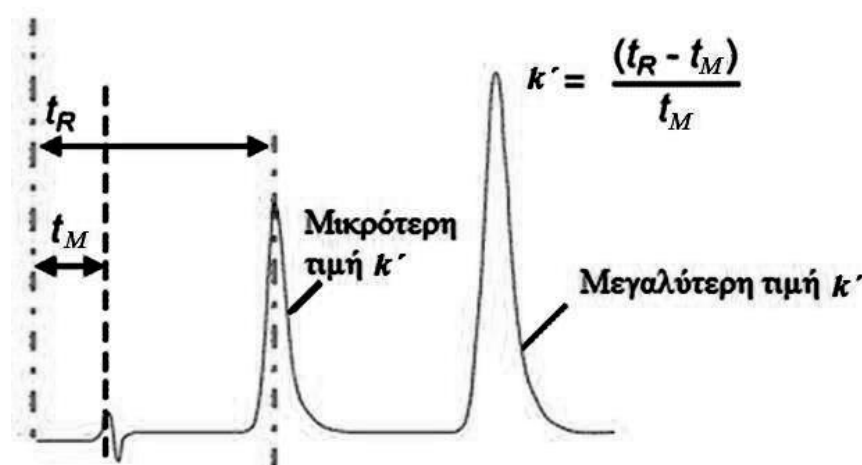
- Παράγοντας κατακράτησης ή χωρητικότητας (k')
- Διαχωριστική ικανότητα (R_s)
- Παράγοντας συμμετρίας χρωματογραφικής κορυφής (T_f)

Παράγοντας κατακράτησης ή χωρητικότητας (k')

Ένας θεμελιώδης τρόπος έκφρασης της κατακράτησης μιας ουσίας στη χρωματογραφική στήλη είναι ο παράγοντας κατακράτησης (ή χωρητικότητας). Ο παράγοντας κατακράτησης ισούται με τον λόγο του χρόνου που παραμένει η ουσία Α στη στατική φάση προς τον χρόνο που αυτή παραμένει στην κινητή φάση:

$$k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M},$$

όπου t_R και t_M ο χρόνος κατακράτησης της ουσίας και ο νεκρός χρόνος κατακράτησης, αντίστοιχα.



Σχήμα 1. Παράγοντας κατακράτησης k'

Ο παράγοντας κατακράτησης είναι ανεξάρτητος μικρών μεταβολών της ροής της κινητής φάσης και των διαστάσεων της στήλης και γι' αυτό ακριβώς το λόγο

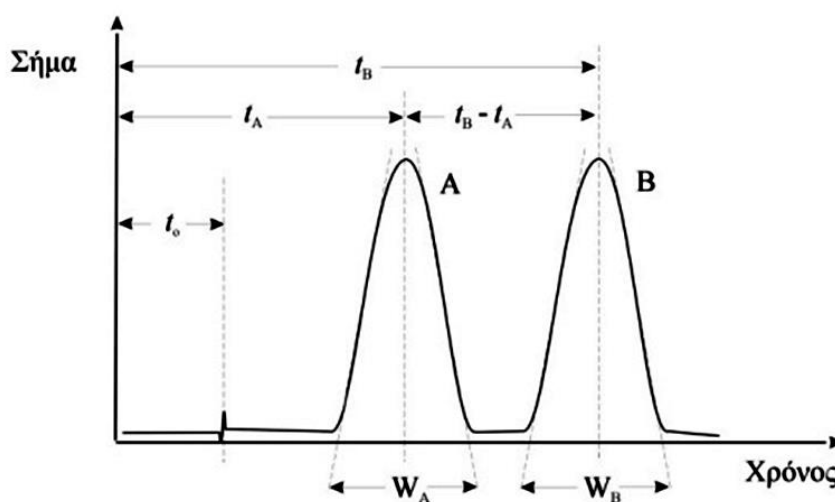
χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στην υγρή χρωματογραφία για τη σύγκριση της κατακράτησης των ουσιών σε διαφορετικές στήλες. Κατά τη βελτιστοποίηση χρωματογραφικών μεθόδων επιδιώκεται οι τιμές που λαμβάνει ο k' να κυμαίνονται από 1 έως 10. Για τιμές $k' < 1$, η έκλουση είναι ταχεία και η ουσία δεν κατακρατείται ισχυρά στη στατική φάση, ενώ για τιμές $k' > 10$, η ουσία κατακρατείται ισχυρά από τη στατική φάση και ο χρόνος παραμονής στη στατική φάση μεγαλώνει, με αποτέλεσμα μη ικανοποιητικό διαχωρισμό.

Διαχωριστική ικανότητα στήλης (R_s)

Η διαχωριστική ικανότητα μιας στήλης αποτελεί ένα μέτρο της ικανότητάς της να διαχωρίσει δύο αναλύτες. Για δύο ουσίες A και B η διαχωριστική ικανότητα ορίζεται ως εξής:

$$R_s = 2(t_B - t_A) / (W_A + W_B)$$

όπου t_A και t_B είναι οι χρόνοι συγκράτησης ή μετακίνησης και W_A , W_B είναι το εύρος της κάθε κορυφής. Κατά τη βελτιστοποίηση χρωματογραφικών μεθόδων επιδιώκεται οι τιμές που λαμβάνει η R_s να είναι μεγαλύτερες του 1. Για τιμές $R_s \leq 1$, οι ουσίες συνεκλούνται, ενώ για τιμές $R_s > 1$, επιτυγχάνεται πλήρης διαχωρισμός των ουσιών.



Σχήμα 2. Υπολογισμός της διαχωριστικής ικανότητας (R_s)

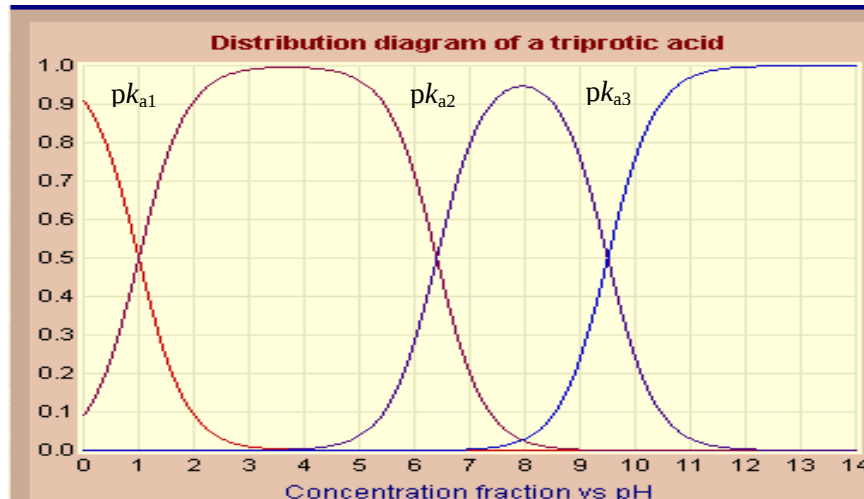
Παράγοντας ασυμμετρίας μιας κορυφής (T_f)

Η ασυμμετρία μιας κορυφής και πιο συγκεκριμένα η εμφάνιση “ουράς” (tailing) ή “μετώπου” (fronting) αποτελεί μια σημαντική παράμετρο καθότι επηρεάζει αρνητικά τόσο την επαναληψιμότητα του χρόνου έκλυσης μιας κορυφής όσο και το διαχωρισμό ενός ζεύγους ενώσεων. Οι βέλτιστες τιμές που λαμβάνει ο παράγοντας T_f πρέπει να είναι ανάμεσα από 0,9 και 1,2. Για τιμές $T_f < 0,9$ εμφανίζεται μέτωπο (fronting) στην κορυφή, ενώ για τιμές $T_f > 1,2$ εμφανίζεται ουρά κορυφής (tailing).

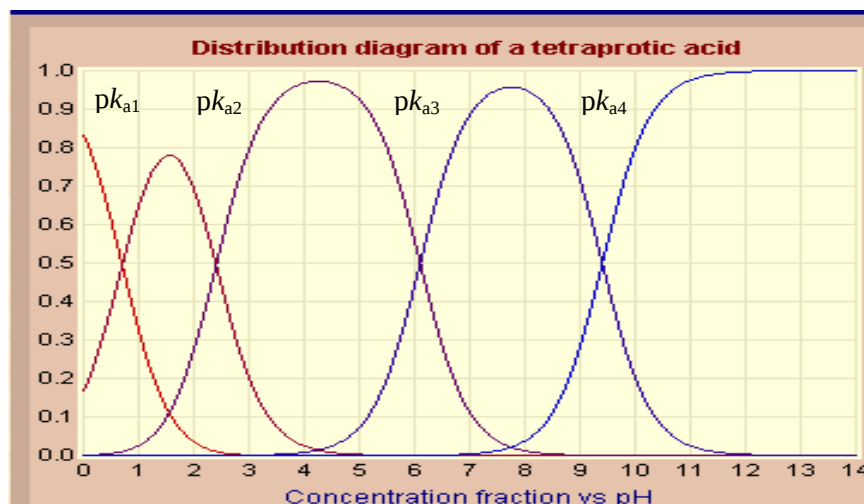
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

Διαγράμματα κατανομής των διαφόρων χημικών σωματιδίων των νουκλεοτιδίων σε σχέση με το pH

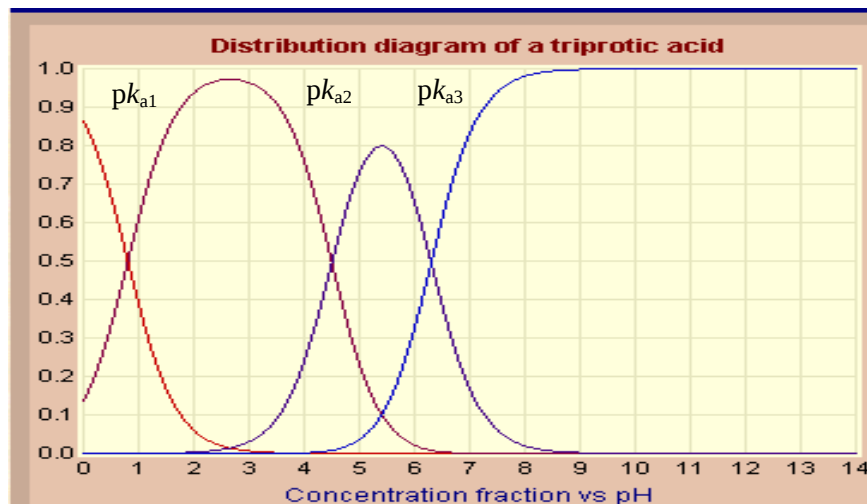
5'-Μονοφωσφορική ουριδίνη, UMP ($pK_{a1}=1$, $pK_{a2}=6,4$, $pK_{a3}=9,5$)



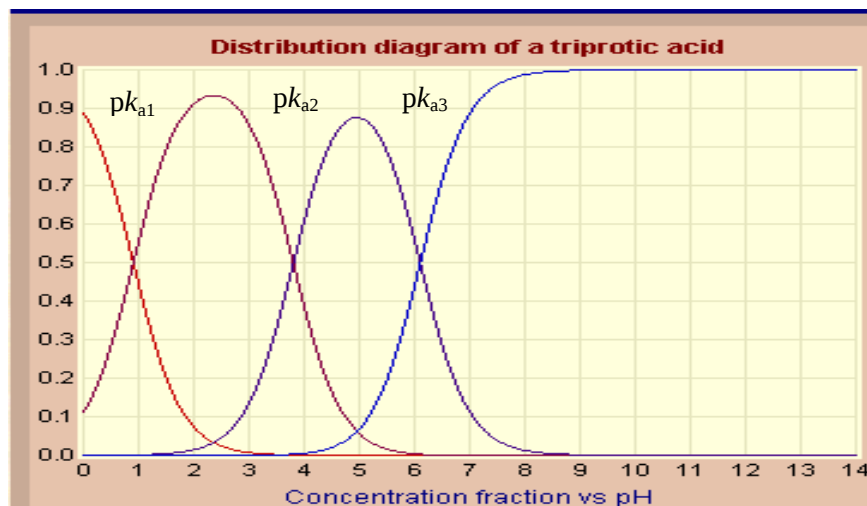
5'-Μονοφωσφορική γουανοσίνη, GMP ($pK_{a1}=0,7$, $pK_{a2}=2,4$, $pK_{a3}=6,1$, $pK_{a4}=9,4$)



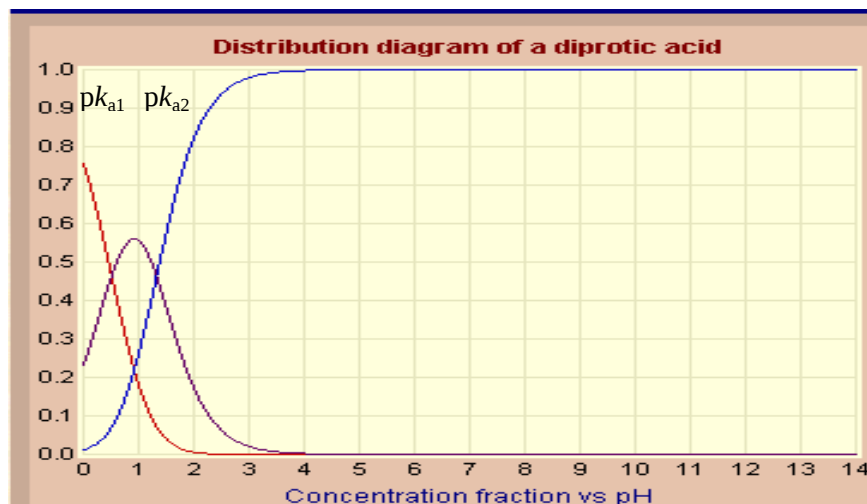
5'-Μονοφωσφορική κυτιδίνη CMP($pK_{a1}=0,8$, $pK_{a2}=4,5$, $pK_{a3}=6,3$)



5'-Μονοφωσφορική αδενοσίνη, AMP($pK_{a1}=0,9$, $pK_{a2}=3,8$, $pK_{a3}=6,1$)



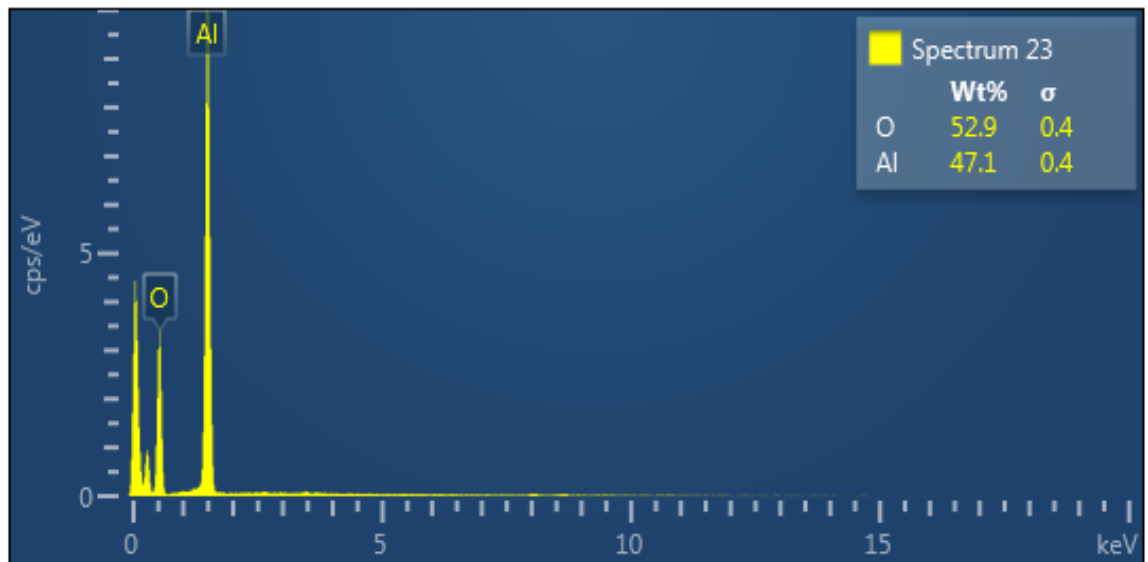
5'-Μονοφωσφορική ινωση, IMP ($pK_{a1}=0,51$, $pK_{a2}=1,3$)



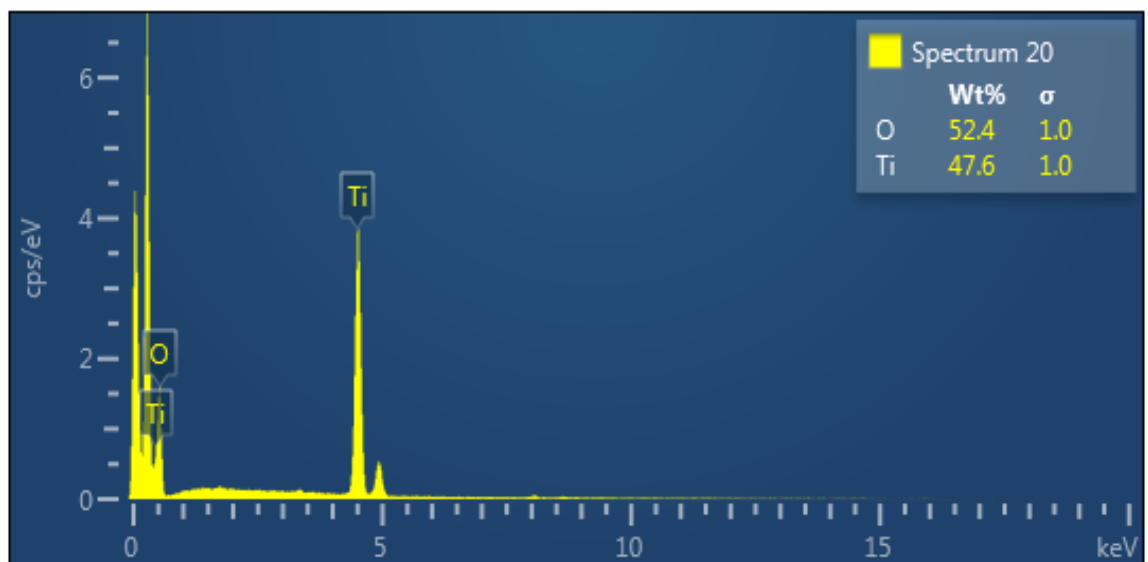
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ

Φασματοσκοπία Διασποράς Ενέργειας Ακτίνων-X (EDX)

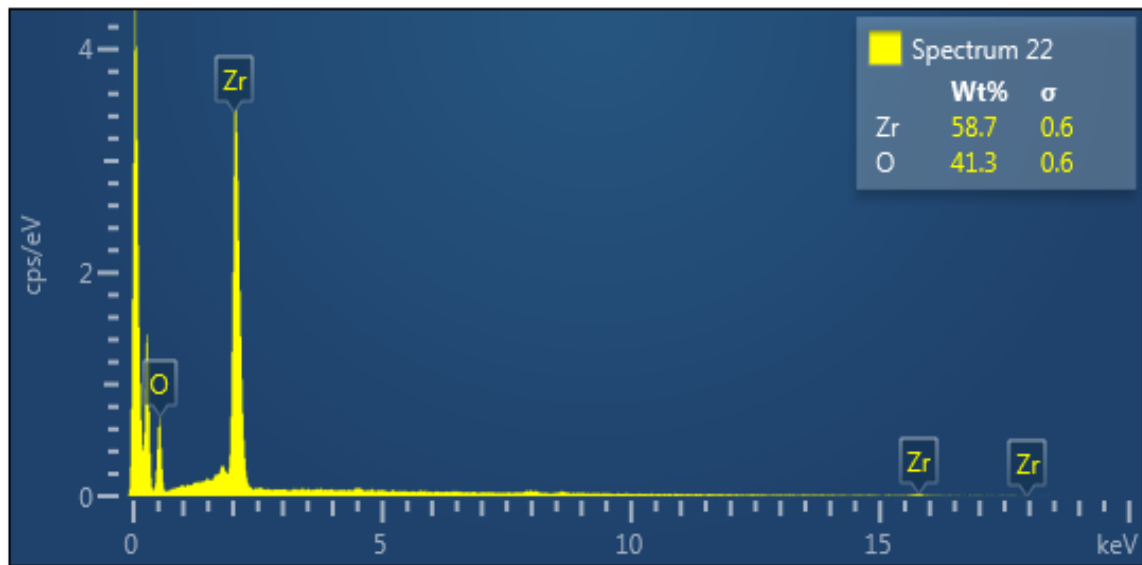
Αλουμίνα



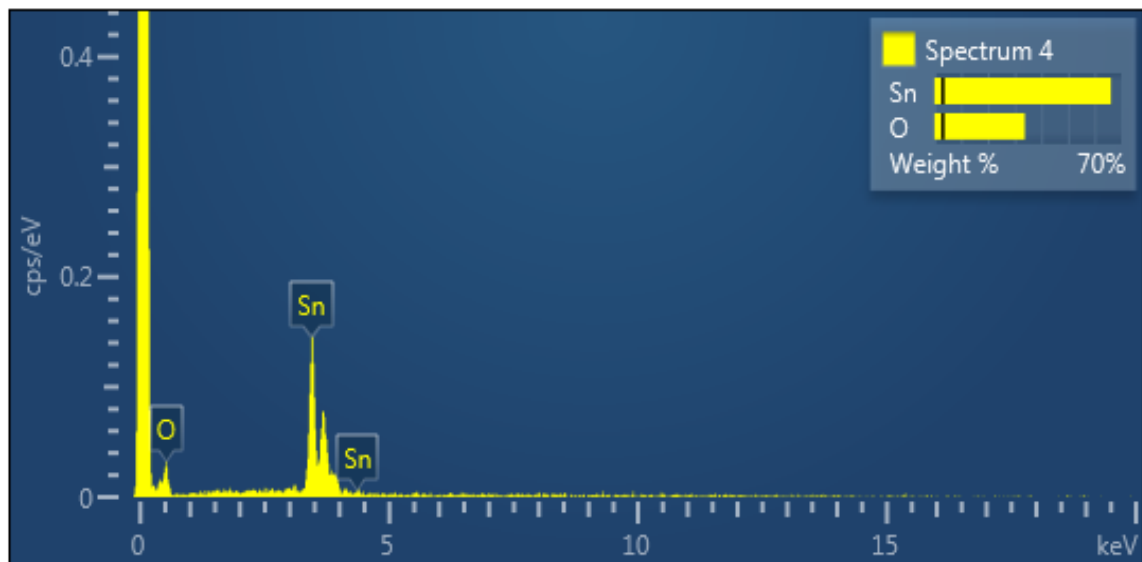
Τιτανία



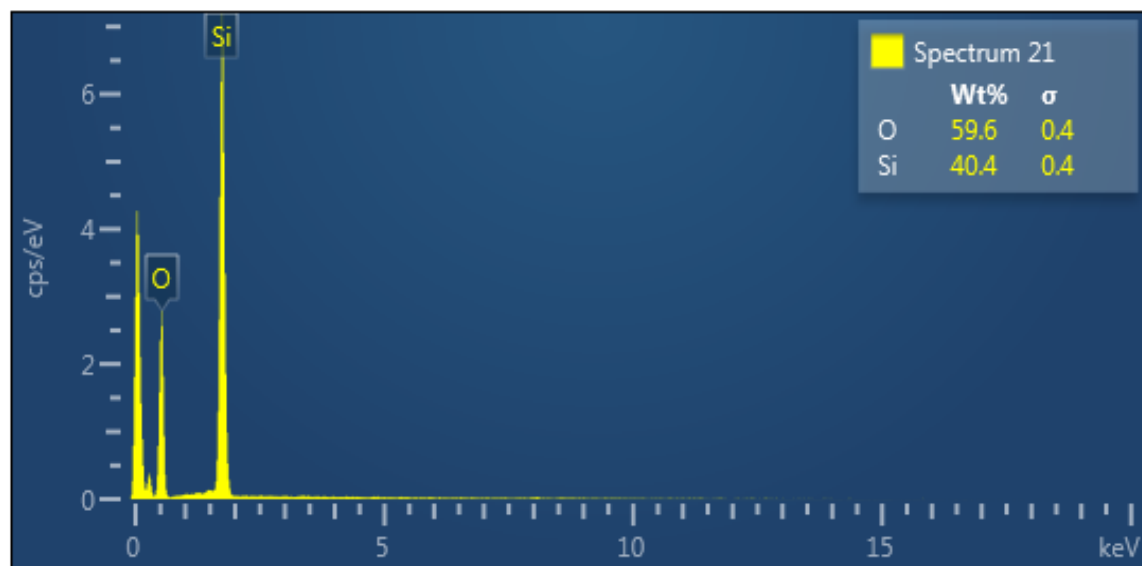
Ζirkονία



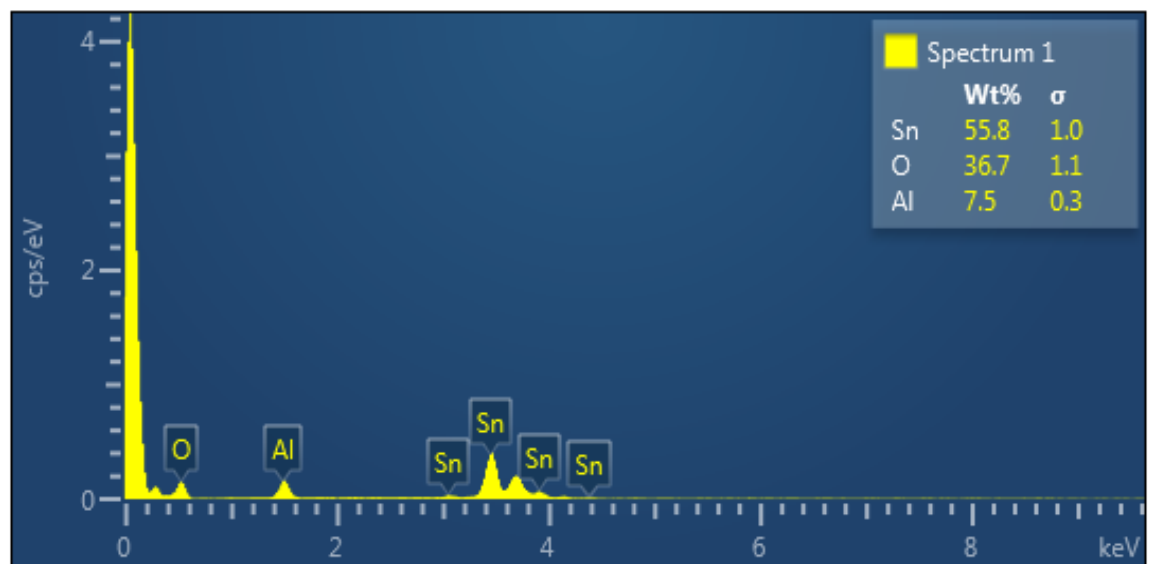
Σταννία



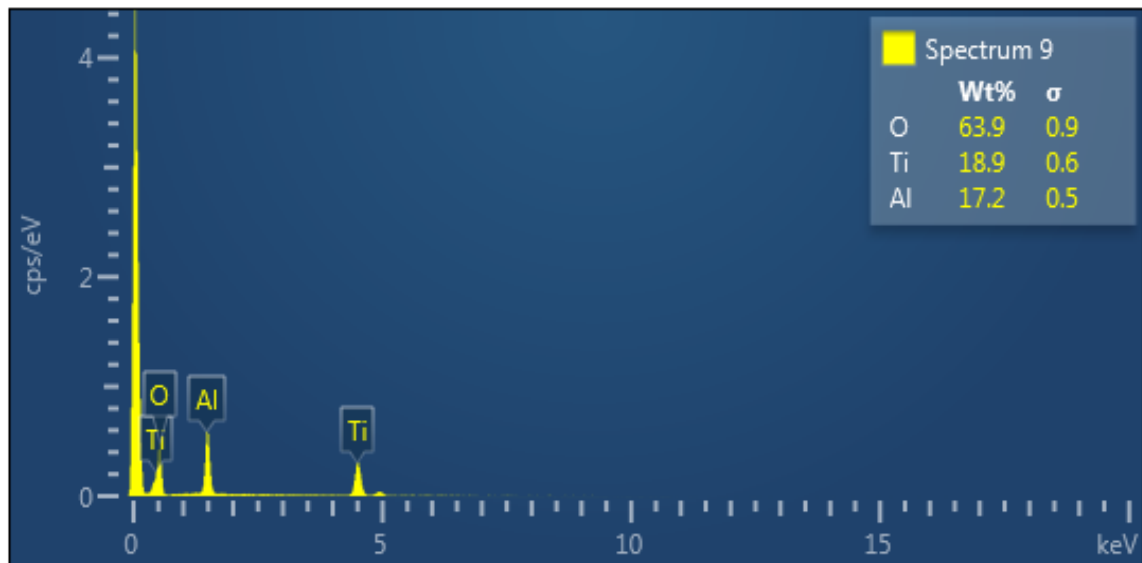
Πορτία



Αλουμίνα-σταννία



Αλουμίνια-τιτανία



Τιτανία-ζirkονία

