



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΥΓΡΗΣ
ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ (DLLME ΚΑΙ DLLME-SFO) ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ
ΠΡΟΣΩΠΙΚΗΣ ΦΡΟΝΤΙΔΑΣ, UV FILTERS, PCMS ΚΑΙ PAES ΣΕ
ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ.**

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΠΑΝΑΓΙΩΤΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ (M. Sc.)

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΥΓΡΗΣ
ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ (DLLME ΚΑΙ DLLME-SFO) ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ
ΠΡΟΣΩΠΙΚΗΣ ΦΡΟΝΤΙΔΑΣ, UV FILTERS, PCMS ΚΑΙ PAES ΣΕ
ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ.**

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΠΑΝΑΓΙΩΤΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ (M. Sc.)

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013

«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»

Ημερομηνία **αίτησης** της κ. Παναγιώτου Αικατερίνης: 09-05-2009

Ορισμός **Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής** από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 746^A/29-05-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Αλμπάνης Τριαντάφυλλος, Καθηγητής Τμ. Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Σταλίκας Κωνσταντίνος, Αναπλ. Καθηγητής Τμ. Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σακκάς Βασίλειος, Λέκτορας Τμ. Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία **ορισμού θέματος**: 29-05-2009

Θέμα: «ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΥΓΡΗΣ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ (DLLME ΚΑΙ DLLME-SFO) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΡΟΣΩΠΙΚΗΣ ΦΡΟΝΤΙΔΑΣ, UV FILTERS, PCMS ΚΑΙ ΡΑΕΣ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 861^A/21-12-2012

1. Τριαντάφυλλος Αλμπάνης, Καθηγητής Τμ. Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Κωνσταντίνος Σταλίκας, Αναπλ. Καθηγητής Τμ. Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Βασίλειος Σακκάς, Λέκτορας Τμ. Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Κωνσταντίνα Κονιδάρη, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμ. Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Αθανάσιος Βλεσσίδης, Αναπλ. Καθηγητής Τμ. Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Μάμας Προδρομίδης, Επίκουρος Καθηγητής Τμ. Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Ιωάννης Κωνσταντίνου, Αναπλ. Καθηγητής Τμ. Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων Πανεπιστημίου Δυτικής Ελλάδος

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «**ΑΡΙΣΤΑ**» στις 06-02-2013

Ο Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας
Τσίκαρης Βασίλειος, Καθηγητής

Η Γραμματέας του Τμήματος
Ελένη Αδαμαντίου

Στη μνήμη του αγαπημένου μου πατέρα

Εξαιρετικά αφιερωμένο στην κόρη μου, Εύα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στα Ερευνητικά Εργαστήρια της Αναλυτικής Χημείας, του Τομέα Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το χρονικό διάστημα 2008-2010.

Το θέμα της παρούσας Διατριβής, μου ανατέθηκε από τον Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Τριαντάφυλλο Αλμπάνη, στον οποίο θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου για την αμέριστη εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου, τις πολύτιμες συμβουλές του και για τη συνεχή επίβλεψη και καθοδήγηση στα πλαίσια της άριστης συνεργασίας μας.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Λέκτορα του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Βασίλη Σακκά η συμβολή του οποίου στην εκπόνηση της παρούσας Διατριβής υπήρξε για εμένα πολύτιμη. Νοιώθω την ανάγκη να τον ευχαριστήσω επιπλέον για την εμπιστοσύνη του, την καθοδήγηση του, το αμέριστο και ανιδιοτελές ενδιαφέρον του, την συμπαράσταση του και γενικότερα για το πολύ υψηλό επίπεδο συνεργασίας που είχαμε εντός και εκτός εργαστηριακού χώρου.

Ευχαριστώ θερμά όλους τους φίλους και συναδέλφους για την κατανόηση τους και την άριστη συνεργασία μας στα πλαίσια εκπόνησης της παρούσας Διατριβής. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την συνάδελφο Χριστίνα Κοσμά για την πολύτιμη βοήθεια της στην διεξαγωγή των δειγματοληψιών.

Ευχαριστώ τις αδελφές μου, Παναγιώτα και Ρωσάνα που ήταν στο πλευρό μου και μου έδωσαν δύναμη και κουράγιο. Ευχαριστώ ολόψυχα, τον φίλο, συνοδοιπόρο και σύζυγο μου Κώστα Στρογγύλη που στάθηκε δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια και μου ενέπνεε τη δύναμη και το κουράγιο να συνεχίσω και να αντιμετωπίσω κάθε εμφανιζόμενο πρόβλημα. Πάνω απ' όλους ευχαριστώ την μητέρα μου, Λένα που με στήριξε ακούραστα και με υπομονή όλα αυτά τα χρόνια.

Κατερίνα Παναγιώτου

Ιωάννινα, 2013

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
1. ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΡΟΣΩΠΙΚΗΣ ΠΕΡΙΠΟΙΗΣΗΣ	15
1.1 Ιστορική Αναδρομή	17
1.2. Τι Είναι Όμως Προϊόντα Προσωπικής Περιποίησης Και Ποιοι Οι Κανόνες Ασφάλειας Τους;	18
1.3. Κατηγορίες Προϊόντων Προσωπικής Περιποίησης	21
1.3.1. Συνθετικά Αρώματα	22
1.3.2. Αντιηλιακοί Παράγοντες (φίλτρα UV)	28
1.3.3. Φθαλικοί Εστέρες (PAEs)	37
1.4. Προϊόντα Προσωπικής Περιποίησης Και Περιβάλλον	40
1.4.1 Οικιακά Και Αστικά Λύματα	44
1.4.2. Επιφανειακά Και Υπόγεια Ύδατα, Θαλασσινό Και Πόσιμο Νερό	46
1.4.3. Έδαφος Και Ιζήματα	48
1.4.4. Χλωρίδα Και Πανίδα	50
1.4.5. Προϊόντα Προσωπικής Περιποίησης Και Η Επίδραση Τους Στον Άνθρωπο	52
1.5. Προϊόντα Μετασχηματισμού Των Πολυκυκλικών Αρωματικών Ενώσεων, HHCB Και AHTN	59
2. ΥΓΡΗ ΥΓΡΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ	63
2.1 Εισαγωγή	65
2.2 Μικροεκχύλιση Της Σταγόνας (SDME)	66
2.2.1. Άμεση Μικροεκχύλιση Της Σταγόνας (DI-SDME)	66
2.2.2. Υπερκείμενης φάσης μικροεκχύλιση της σταγόνας (HS-SDME)	67
2.2.3. Υγρή Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση (LLLME)	67
2.2.4. Συνεχούς Ροής Μικροεκχύλιση (CFME)	68
2.3. Υγρής Φάσης Μικροεκχύλιση της Ίνας (HF-LPME)	69
2.4. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς (DLLME)	71

2.4.1. Παράγοντες Που Επηρεάζουν Την DLLME Μέθοδο	72
2.4.1.1. Επιλογή Διαλύτη Εκχύλισης	73
2.4.1.2. Επιλογή Διαλύτη Διασποράς	74
2.4.1.3. Όγκος Διαλύτη Εκχύλισης	75
2.4.1.4. Όγκος Διαλύτη Διασποράς	76
2.4.1.5. Επίδραση Του Χρόνου Εκχύλισης	76
2.4.1.6. Ιοντική Ισχύς	77
2.4.2. Βελτιστοποίηση Της DLLME Μεθόδου	77
2.4.3. Εφαρμογές Της DLLME Μεθόδου	79
2.4.3.1. DLLME Σε Συνδυασμό Με GC	79
2.4.3.2. DLLME Σε Συνδυασμό Με HPLC	85
2.4.3.3. DLLME Σε Συνδυασμό Με Άλλα Όργανα	90
2.5. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς Βασιζόμενη Στην Στερεοποίηση Της Επιπλέουσας Οργανικής Φάσης (DLLME-SFO)	93
2.5.1. Βελτιστοποίηση Της DLLME-SFO Μεθόδου	94
2.5.2. Παράγοντες Που Επηρεάζουν Την DLLME-SFO	95
2.5.2.1. Επιλογή Διαλύτη Εκχύλισης	96
2.5.2.2. Όγκος Διαλύτη Εκχύλισης	96
2.5.3. Εφαρμογές Της DLLME-SFO Μεθόδου	97
2.6. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς Συνδυαζόμενη Με Ιοντικό Διαλύτη Υγρής Φύσεως (IL-DLLME)	98
3. ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ	101
3.1. Εισαγωγή	103
3.2. Εισαγωγή Στην Στατιστική Ανάλυση	104
3.2.1. Δοκιμασία Student (t-Test)	106
3.2.2. Δοκιμασία F (F-test)	110
3.3. Ανάλυση Διακύμανσης (Analysis Of Variance, ANOVA)	112
3.3.1. Ανάλυση Διακύμανσης Ενός Παράγοντα (One-Way ANOVA)	112
3.3.2. Ανάλυση Διακύμανσης Με Δυο Παράγοντες (two-way ANOVA)	115

3.4. Πειραματικός Σχεδιασμός	117
3.5. Παραγοντικά Πειράματα (Factorial Experiment)	117
3.6. Δυο επιπέδων σχεδιασμός (two-level design)	119
3.6.1. Πλήρης Παραγοντικός Σχεδιασμός (Full factorial design)	119
3.6.2. Κλασματικός Παραγοντικός Σχεδιασμός (fractional factorial design)	120
3.7. Μέθοδος Απόκρισης Επιφάνειας	123
3.7.1. Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)	123
3.7.2. Μαθηματικό Μοντέλο	126
3.7.3. Βελτιστοποίηση Πολλαπλών Αποκρίσεων - Μέθοδος Της Επιθυμητής Συνάρτησης (Desirability Function, D)	127

4. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ 131

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. Πειραματικό Μέρος-Υλικά, Αντιδραστήρια	135
5.1. Υλικά	137
5.1.1. Αντιδραστήρια Και Διαλύτες	137
5.1.2. Επιλογή Πρότυπων Ουσιών Και Διαλύματα Αυτών	137
5.2. Αναλυτικά Όργανα Και Σκεύη	138
5.2.1. Αέριος Χρωματογράφος Συζευγμένος με Φασματογράφο Μάζας (GC-MS)	139
5.2.2. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Συζευγμένη Με Ανιχνευτή Υπεριώδους Ακτινοβολίας (HPLC-UV/DAD)	141
5.2.3. Χρωματογραφικός Διαχωρισμός Και Ποσοτικοποίηση	142
5.3. Δείγματα	143
5.3.1. Δείγματα Υδάτων	143
5.3.2. Δείγματα Εδάφους	143
5.4. Λειτουργία Των Μονάδων Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων Της Πόλης Των Ιωαννίνων	145
5.4.1. Γενικά	145

5.4.2. Στάδια Επεξεργασίας Των ΜΕΥΑ	145
5.4.3. Δείγματα Από Τις Μονάδες Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων (ΜΕΥΑ) Της Πόλης Των Ιωαννίνων	148
5.5. Επιμόλυνση Και Τρόπος Αποφυγής	149

6. Ανάπτυξη, Βελτιστοποίηση Και Εφαρμογή Της DLLME Σε

Επιφανειακά Ύδατα Για Τον Προσδιορισμό Των Επιλεγμένων Φίλτρων UV, PCMs Και PAEs Σε Συνδυασμό Με Χημειομετρικές Μεθόδους

6.1. Βελτιστοποίηση της Υγρής Υγρής Μικροεκχύλισης Διασποράς (DLLME) σε επιφανειακά ύδατα για τα φίλτρα UV	153
6.1.1. Χρωματογραφική τεχνική	153
6.1.2. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς (DLLME)	156
6.1.3. Προκαταρκτικά Πειράματα	156
6.1.4. Πολυπαραγοντική Μέθοδος	158
6.1.4.1. Σχεδιασμός Αξιολόγησης Plackett-Burman	158
6.1.4.2. Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)	162
6.1.4.3. Βελτιστοποίηση Με Τη Μέθοδο Της Επιθυμητής Συνάρτησης (Desirability Function)	169
6.1.5. Επικύρωση της DLLME μεθόδου	171
6.1.5.1. Γραμμικότητα, πιστότητα και ευαισθησία της μεθόδου	171
6.1.5.2. Δείγματα Νερού	173
6.2. Βελτιστοποίηση Της Υγρής Υγρής Μικροεκχύλισης Διασποράς (DLLME) Σε Επιφανειακά Ύδατα Για Τις PCMs Και Τους PAEs	174
6.2.1. Χρωματογραφική Τεχνική	174
6.2.2. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς (DLLME)	175
6.2.3. Προκαταρκτικά Πειράματα	176
6.2.4. Πολυπαραγοντική Μέθοδος	176
6.2.4.1. Σχεδιασμός Αξιολόγησης Plackett-Burman	176
6.2.4.2. Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)	180

6.2.4.3. Βελτιστοποίηση Με Τη Μέθοδο Της Επιθυμητής Συνάρτησης (Desirability Function)	186
6.2.5. Επικύρωση Της DLLME Μεθόδου	188
6.2.5.1. Γραμμικότητα, Πιστότητα Και Ευαισθησία Της Μεθόδου	188
6.2.5.2. Δείγματα Νερού	189

7. Ανάπτυξη, Βελτιστοποίηση Και Εφαρμογή Της DLLME Σε Στερεό Υπόστρωμα (Εδάφη) Για Τον Προσδιορισμό Των Επιλεγμένων Φίλτρων UV, PCMs Και PAEs Σε Συνδυασμό Με Χημειομετρικές Μεθόδους.

7.1. Βελτιστοποίηση Της Υγρής Υγρής Μικροεκχύλισης Διασποράς (DLLME) Σε Στερεό Υπόστρωμα Για Τα Φίλτρα UV	193
7.1.1. Χρωματογραφική Τεχνική	193
7.1.2. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς (DLLME) Σε Στερεό Υπόστρωμα	194
7.1.3. Πολυπαραγοντική Μέθοδος	194
7.1.3.1. Σχεδιασμός Αξιολόγησης Plackett-Burman	195
7.1.3.2. Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)	198
7.1.3.3. Βελτιστοποίηση Με Τη Μέθοδο Της Επιθυμητής Συνάρτησης (Desirability Function)	203
7.1.4. Επικύρωση Της DLLME Μεθόδου Σε Στερεό Υπόστρωμα	205
7.1.4.1. Γραμμικότητα, Πιστότητα Και Ευαισθησία Της Μεθόδου	205
7.1.4.2. Δείγματα Εδάφους	207
7.2. Βελτιστοποίηση Της Υγρής Υγρής Μικροεκχύλισης Διασποράς (DLLME) Σε Στερεό Υπόστρωμα Για Τις PCMs Και Τους PAEs	209
7.2.1. Χρωματογραφική Τεχνική	209
7.2.2. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς (DLLME) Σε Στερεό Υπόστρωμα	209
7.2.3. Πολυπαραγοντική Μέθοδος	210
7.2.3.1. Σχεδιασμός Αξιολόγησης Plackett-Burman	210
7.2.3.2. Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)	210
7.2.3.3. Βελτιστοποίηση Με Τη Μέθοδο Της Επιθυμητής Συνάρτησης (Desirability Function)	220

7.2.4. Επικύρωση Της DLLME Μεθόδου Σε Στερεό Υπόστρωμα	222
7.2.4.1. Γραμμικότητα, Πιστότητα Και Ευαισθησία Της Μεθόδου	222
7.1.4.2. Δείγματα Εδάφους	223

8. Ανάπτυξη, Βελτιστοποίηση Και Εφαρμογή Της Υγρής Υγρής Μικροεκχύλισης Διασποράς Βασιζόμενη Στην Στερεοποίηση Της Επιπλέουσας Οργανικής Φάσης (DLLME-SFO) Σε Επιφανειακά Ύδατα Για Τον Προσδιορισμό Των Επιλεγμένων Φίλτρων UV, PCMs Και PAEs Σε Συνδυασμό Με Χημειομετρικές Μεθόδους.	225

8.1. Βελτιστοποίηση της Υγρής Υγρής Μικροεκχύλισης Διασποράς βασιζόμενη στην Στερεοποίηση της Επιπλέουσας Οργανικής Φάσης (DLLME-SFO) σε επιφανειακά ύδατα για τα φίλτρα UV	227
8.1.1. Χρωματογραφική Τεχνική	227
8.1.2. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς Βασιζόμενη Στην Στερεοποίηση Της Επιπλέουσας Οργανικής Φάσης (DLLME-SFO)	228
8.1.3. Προκαταρκτικά Πειράματα	229
8.1.4. Πολυπαραγοντική Μέθοδος	230
8.1.4.1. Σχεδιασμός Αξιολόγησης Plackett-Burman	230
8.1.4.2. Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)	233
8.1.4.3. Βελτιστοποίηση Με Τη Μέθοδο Της Επιθυμητής Συνάρτησης (Desirability Function)	240
8.1.5. Επικύρωση Της DLLME-SFO Μεθόδου	241
8.1.5.1. Γραμμικότητα, Πιστότητα Και Ευαισθησία Της Μεθόδου	241
8.1.5.2. Δείγματα Νερού	243
8.2. Σύγκριση Των DLLME Και DLLME-SFO Μεθόδων	245
8.3. Βελτιστοποίηση Της Υγρής Υγρής Μικροεκχύλισης Διασποράς Βασιζόμενη Στην Στερεοποίηση Της Επιπλέουσας Οργανικής Φάσης (DLLME-SFO) Σε Επιφανειακά Ύδατα Για Τις PCMs Και Τους PAEs	249
8.3.1. Χρωματογραφική Τεχνική	249

8.3.2. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς Βασιζόμενη Στην Στερεοποίηση Της Επιπλέουσας Οργανικής Φάσης (DLLME-SFO)	249
8.3.3. Πολυπαραγοντική Μέθοδος	250
8.3.3.1. Σχεδιασμός Αξιολόγησης Plackett-Burman	250
8.3.3.2. Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)	254
8.3.3.3. Βελτιστοποίηση Με Τη Μέθοδο Της Επιθυμητής Συνάρτησης (Desirability Function)	261
8.3.4. Επικύρωση Της DLLME-SFO Μεθόδου	263
8.3.4.1. Γραμμικότητα, Πιστότητα Και Ευαισθησία Της Μεθόδου	263
8.3.4.2. Δείγματα Νερού	264
8.4. Σύγκριση Των DLLME Και DLLME-SFO Μεθόδων	266

9. Ανάπτυξη, Βελτιστοποίηση Και Εφαρμογή Της Υγρής-Υγρής Μικροεκχύλισης Διασποράς Βασιζόμενη Στην Στερεοποίηση Της Επιπλέουσας Οργανικής Φάσης (DLLME-SFO) Σε Επιφανειακά Ύδατα Και Εδάφη Για Τον Προσδιορισμό Των Επιλεγμένων Φίλτρων UV, PCMs Και PAEs Σε Συνδυασμό Με Χημειομετρικές Μεθόδους.

9.1. Εισαγωγή	271
9.2. Χρωματογραφική Τεχνική	271
9.3. Εφαρμογή Της DLLME-SFO Μεθόδου Σε Επιφανειακά Ύδατα	274
9.3.1. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς Βασιζόμενη Στην Στερεοποίηση Της Επιπλέουσας Οργανικής Φάσης (DLLME-SFO)	274
9.3.2 Προκαταρκτικά Πειράματα	274
9.3.3. Πολυπαραγοντική Μέθοδος	275
9.3.3.1. Σχεδιασμός Αξιολόγησης Plackett-Burman	275
9.3.3.2. Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)	278
9.3.3.3. Βελτιστοποίηση Με Τη Μέθοδο Της Επιθυμητής Συνάρτησης (Desirability Function)	287
9.3.4. Επικύρωση Της DLLME-SFO Μεθόδου	290

9.3.4.1. Γραμμικότητα, Πιστότητα Και Ευαισθησία Της Μεθόδου	290
9.4. Εφαρμογή Της DLLME-SFO Μεθόδου Σε Στερεό Υπόστρωμα	293
9.4.1. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς Βασιζόμενη Στην Στερεοποίηση Της Επιπλέουσας Οργανικής Φάσης (DLLME-SFO)	293
9.4.2. Πολυπαραγοντική Μέθοδος	293
9.4.2.1. Σχεδιασμός Αξιολόγησης Plackett-Burman	293
9.4.2.2. Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)	296
9.4.2.3. Βελτιστοποίηση Με Τη Μέθοδο Της Επιθυμητής Συνάρτησης (Desirability Function)	301
9.4.3. Επικύρωση Της DLLME-SFO Μεθόδου Σε Στερεό Υπόστρωμα	303
9.4.3.1. Γραμμικότητα, Πιστότητα Και Ευαισθησία Της Μεθόδου	303
9.4.3.2. Δείγματα Εδάφους	304

10. Εφαρμογή Της DLLME-SFO Μεθόδου Σε Υγρά Απόβλητα Και Ιλύς Των Μονάδων Επεξεργασίας Υγρών Απόβλητων Της Πόλης Των Ιωαννίνων.

10.1. Εισαγωγή	311
10.2. Σκοπός	312
10.3. Πειραματική Διαδικασία	312
10.3.1. Ανάλυση Δειγμάτων	312
10.3.2. Προετοιμασία Δειγμάτων	313
10.3.3. Σημεία Δειγματοληψίας	313
10.3.4. Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά Των Υγρών Και Στερεών Αποβλήτων Στο Βιολογικό Καθαρισμό	314
10.4. Αποτελέσματα Και Συζήτηση	316
10.4.1. Εφαρμογή Της DLLME-SFO Σε Υγρά Απόβλητα	316
10.4.2. Επίπεδα Συγκεντρώσεων Των Επιλεγμένων Αναλυτών Σε Δείγματα Υγρών Αποβλήτων	318
10.4.3. Ποσοστά Απομάκρυνσης Των Επιλεγμένων Αναλυτών Κατά Την Επεξεργασία Των Λυμάτων Στις Εγκαταστάσεις Του Βιολογικού Καθαρισμού	321

10.4.4. Επίπεδα Συγκεντρώσεων Και Ποσοστά Απομάκρυνσης Των Επιλεγμένων Αναλυτών Σε Δείγματα Στερεών Αποβλήτων (Ιλύς)	323
10.5. Συμπεράσματα	326
11. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	327
12. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	341
13. SUMMARY	347
14. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	351
15. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	375
16. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ	381

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΡΟΣΩΠΙΚΗΣ ΠΕΡΙΠΟΙΗΣΗΣ

1.1. Ιστορική Αναδρομή

Από την αρχαιότητα η χρήση των προϊόντων προσωπικής περιποίησης ήταν ευρέως διαδεδομένη. Οι Σουμέριοι, οι Βαβυλώνιοι, οι Αιγύπτιοι και οι Έλληνες τα χρησιμοποιούσαν για τελετουργικούς και θεραπευτικούς σκοπούς, καθώς και για λόγους αισθητικής και διακόσμησης. Είναι γνωστή η χρήση του μαλαχίτη (πράσινου χρώματος), ο οποίος εμφανίζει άριστη αντι-βακτηριδιακή δράση και ίσως να είναι και το πρώτο χρησιμοποιούμενο συντηρητικό στην ιστορία της κοσμετολογίας [1].

Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι θεωρούνταν οι διδάσκαλοι της επιστήμης των καλλυντικών, με την αρωματοθεραπεία να έχει τις ρίζες της στο 1600 π.Χ.. Οι αρχαίοι Έλληνες ήταν οι πρώτοι Ευρωπαίοι που χρησιμοποίησαν αρωματικά έλαια και αλοιφές σαν ένα είδος make-up ενώ στα σκοτεινά χρόνια του Μεσαίωνα, τα ιατρικά και επιστημονικά χειρόγραφα που διασώθηκαν με τη βοήθεια των μοναχών και των καθεδρικών ναών, έχουν αναφορές τόσο σε ιατρικές συνταγές όσο και στα καλλυντικά. Στους αιώνες που ακολούθησαν (11^{ου} - 13^{ου} αιώνα) και πιο συγκεκριμένα στα χρόνια των Σταυροφοριών, οι γυναίκες χρησιμοποιούσαν το *“Arabic kohl”*, ένα από τα πιο γνωστά καλλυντικά μέχρι και σήμερα (το γνωστό eyeliner). Το *“Arabic kohl”* το χρησιμοποιούσαν τόσο για αισθητικούς (μακιγιάζ ματιών και βλεφαρίδων) όσο και για ιατρικούς λόγους (ίαση βλεφαρόπτωσης), σε μορφή μαύρης πούδρας [2].

Ο 16^{ος} αιώνας ήταν ο αιώνας των λευκών προσώπων [3] με τις γυναίκες να βάφουν τα πρόσωπα τους με μια λευκή βαφή (μείγμα από λευκό μόλυβδο και ξύδι). Ο λευκός μόλυβδος ενίοτε αναμειγνυόταν με $HgCl_2$ και χρησιμοποιείτο σαν καθαριστικό προσώπου ενώ μια αλοιφή θειικού υδραργύρου χρησιμοποιείτο για την απομάκρυνση των φακίδων. Τον 17^ο και 18^ο αιώνα η χρήση των καλλυντικών ήταν προνόμιο των πλούσιων και ισχυρών γυναικών, με το μόλυβδο να είναι το κύριο συστατικών αυτών. Οι πρώτες ασθένειες όμως άρχισαν να εμφανίζονται και οφείλονταν σε προϊόντα που είχαν σαν βάση το μόλυβδο. Η *Marie Gunning* (γόνος της οικογένειας Gunning της Ιρλανδίας και οπαδός των λευκών προσώπων της

εποχής) πέθανε το 1760 μ.Χ. με τις εφημερίδες να αναφέρουν ότι ήταν «θύμα των καλλυντικών». Επτά χρόνια αργότερα η *Kitty Fisher*, μια διάσημη ηθοποιός της εποχής, πέθανε από δηλητηρίαση που προήλθε από τον μόλυβδο [4]. Τον 19^ο αιώνα και προς το τέλος του (1869 μ.Χ.), τρεις περιπτώσεις δηλητηρίασης οφειλόμενες στη χρήση ενός καλλυντικού που ονομαζόταν «*Laird's Bloom of Youth*» αναφέρθηκαν από τον γιατρό L.A. Sayre. Η λευκή αυτή λοσιόν περιείχε μόλυβδο και οι άτυχες γυναίκες την χρησιμοποιούσαν κάθε μήνα για 2 έως 5 χρόνια. Τον επόμενο μόλις χρόνο (1870 μ.Χ.) ο γιατρός *Chandler* δημοσίευσε μια λίστα με επικίνδυνα καλλυντικά (λοσιόν, σαμπουάν, πούδρες) στο αμερικάνικο περιοδικό *Metropolitan Bureau of Health*. Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα και πιο συγκεκριμένα το 1930 μ.Χ., προϊόντα αποτρίχωσης που είχαν σαν κύριο συστατικό το θάλιο αναφέρθηκαν ότι προκαλούσαν πόνο και δυσκαμψία ενώ πιο σπάνια θάνατο [5]. Στα χρόνια που ακολούθησαν (1960 μ.Χ.) σε Ευρώπη και Αμερική, αποσμητικά η σύνθεση των οποίων αποτελείτο από ζirkόνιο, βρέθηκαν να προκαλούν φλεγμονές μακράς διάρκειας [6, 7]. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, από τα αρχαία χρόνια μέχρι τον μεσαίωνα και τα μέσα του 20^{ου} αιώνα, τα προϊόντα προσωπικής περιποίησης περιείχαν υψηλής τοξικότητας μέταλλα όπως μόλυβδο, υδράργυρο και κάδμιο. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 50 χρόνων, η βιομηχανία των καλλυντικών έχει αναπτυχθεί ευρέως και παρότι έχει απαγορευτεί η χρήση τοξικών ουσιών σε αυτά, δεν είναι όλα ασφαλή. Μέχρι σήμερα σοβαρά περιστατικά δεν έχουν αναφερθεί, όμως δεν λείπουν οι δερματίτιδες, οι αλλεργίες και οι ερεθισμοί.

1.2. Τι Είναι Όμως Προϊόντα Προσωπικής Περιποίησης Και Ποιοι Οι Κανόνες Ασφάλειας Τους;

Παγκοσμίως υπάρχουν τρεις ρυθμιστικές αρχές που είναι υπεύθυνες για την ασφάλεια των Προϊόντων Προσωπικής Περιποίησης. Αυτές είναι : η *European Union (EU) Cosmetics Directive*, η *United States (US) Food and Drug Administration (FDA)* και η Επίσημη Νομοθεσία που ορίζεται από τις αρχές της Ιαπωνίας.

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ, 2007) [8] ο επίσημος ορισμός που αποδίδεται στα Προϊόντα Προσωπικής Περιποίησης (ΠΠΠ) είναι: «ΠΠΠ είναι οποιαδήποτε ουσία ή συνδυασμός ουσιών, οι οποίες έρχονται σε επαφή με τα εξωτερικά τμήματα του ανθρώπινου σώματος όπως επιδερμίδα, μαλλιά, νύχια, χείλια και δόντια.». Αντίστοιχα, μια παραπλήσια ερμηνεία με αυτή που αποδίδεται από την ΕΕ, αναφέρει και η FDA [9]: «ΠΠΠ είναι εκείνα τα προϊόντα, τα οποία εξ ορισμού έρχονται σε επαφή με το ανθρώπινο σώμα μέσω ψεκασμού ή επάλειψης, για λόγους αισθητικής ή καθαρισμού και δεν περιέχουν σαπούνι.»

Οι κανόνες ασφάλειας που διέπουν τα Προϊόντα Προσωπικής Περιποίησης στις ΗΠΑ διαφέρουν ελαφρώς σε σχέση με την ΕΕ, διατηρώντας όμως εξίσου, σε υψηλό επίπεδο την ασφάλεια των καταναλωτών. Σύμφωνα με την ΕΕ, όλα τα παρασκευάσματα κατατάσσονται στην κατηγορία των «καλλυντικών». Αντίθετα, στις ΗΠΑ υπάρχει η κατηγορία «*Over-the-Counter*» δηλαδή των φαρμάκων-καλλυντικών. Ο ορισμός «*Over-the-Counter*» αποδίδεται στα προϊόντα εκείνα που δρουν ταυτόχρονα σαν καλλυντικά αλλά και σαν θεραπευτικές ουσίες π.χ. αντιηλιακά, αποσμητικά, αντιπιτυριδικά [10].

Στην Ανατολική Κινά και Ιαπωνία, οι θεσπισμένοι κανόνες ασφαλείας των Προϊόντων Προσωπικής Περιποίησης είναι περισσότερο αυστηροί σε σχέση με την ΕΕ και τις ΗΠΑ. Δεδομένου ότι ο ορισμός που αποδίδεται είναι παραπλήσιος με αυτό των ΗΠΑ, οι Ιαπωνικές αρχές έχουν θεσπίσει μια ακόμα κατηγορία, τα «*quasi-drugs*» δηλαδή τα ημι-φάρμακα π.χ. βαφές μαλλιών. Ο ορισμός *quasi-drugs* αναφέρεται στις ουσίες που έχουν μηδενική επίδραση στο ανθρώπινο οργανισμό. Για παράδειγμα, ένα αντιηλιακό προϊόν στην ΕΕ κατατάσσεται στην κατηγορία των καλλυντικών ενώ στις ΗΠΑ στην αντίστοιχη *Over-the-Counter* κατηγορία. Επιπλέον, μια βαφή μαλλιών στην ΕΕ κατατάσσεται στην κατηγορία των καλλυντικών ενώ στην Ιαπωνία θεωρείται *quasi-drug*. Αξίζει να αναφέρουμε ότι το μοντέλο και οι κανόνες ασφαλείας που ισχύουν στην Ιαπωνία έχουν υιοθετηθεί και από άλλες ασιατικές χώρες, όπως η Ταϊβάν, η νότια Κορέα και η Κίνα.

Παρόλο που οι διεθνείς κανόνες για τα Προϊόντα Προσωπικής Περιποίησης έχουν τον ίδιο στόχο, δηλαδή την ασφάλεια των καταναλωτών, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην προσέγγιση τους. Έτσι συνιστάται η αξιολόγηση της επικινδυνότητας του κάθε προϊόντος με μελέτες δερματικής τοξικότητας, με δοκιμές in vitro κ.α.. Σύμφωνα με τη ΕΕ, στο «*Notes of Guidance for the Testing of Cosmetics Ingredients and their Safety Evaluation*» αναφέρονται οι προδιαγραφές που πρέπει να πληρούνται ώστε να θεωρηθεί κάποιο συστατικό ασφαλές [11]. Τα κριτήρια που απαιτείται να έχουν ελεγχθεί προτού να διατεθεί κάποιο προϊόν είναι:

- ☞ Η τοξικότητα
- ☞ Απορρόφηση / διείσδυση από το δέρμα
- ☞ Δερματικός ερεθισμός
- ☞ Ερεθισμός των βλεννογόνων μεμβρανών
- ☞ Ευαισθησία του δέρματος
- ☞ Γενετική τοξικότητα

Όταν κάποιο από τα παραπάνω κριτήρια δεν πληρείται, τότε είναι απαραίτητο να ελεγχθεί περαιτέρω με πειράματα τοξικότητας, καρκινογένεσης και τερατογένεσης. Σύμφωνα με την νομοθεσία της ΕΕ, για να κριθεί ένα προϊόν ασφαλές προς χρήση θα πρέπει να κατατίθεται από τους υπεύθυνους μια λεπτομερής λίστα, πιστοποιημένη από ειδικό επιστήμονα, στην οποία θα αναφέρονται όλες οι απαραίτητες πληροφορίες που αναφέραμε παραπάνω [12, 13].

Στις Ηνωμένες Πολιτείες, το 1976 ο οργανισμός *Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association (CTFA)*, που έχει μετονομαστεί στο *Personal Care Products Council (PCPC)*, ίδρυσε την επιτροπή *Cosmetic Ingredient Review (CIR)*. Η επιτροπή αυτή, αποτελείται από ειδικούς επιστήμονες, τοξικολόγους, δερματολόγους και χημικούς, οι οποίοι ελέγχουν και αποφασίζουν πότε και αν ένα προϊόν είναι ασφαλές [14]. Σύμφωνα με την CIR, για να κρίνει εάν κάποιο συστατικό του προϊόντος είναι ασφαλές, θα πρέπει να έχει ελεγχθεί επιτυχώς από τους παρασκευαστές για τα παρακάτω:

- ☞ Συγκέντρωση της ουσίας
- ☞ Το εργοστάσιο παραγωγής, τα χημικά δεδομένα και προσμείξεις
- ☞ Ευαισθησία του δέρματος και ερεθισμός
- ☞ Προσρόφηση του δέρματος. Αν είναι σημαντική τότε ακολουθεί έλεγχος της τοξικότητας του προϊόντος όπως γίνεται και στην περίπτωση της ΕΕ.
- ☞ Γενετική τοξικότητα. Αν είναι θετική απαιτείται έλεγχος καρκινογένεσης από το προϊόν για δυο χρόνια.
- ☞ Φύση συστατικών και η χρήση τους

Στη συνέχεια, τα δεδομένα αξιολογούνται από την επιτροπή χαρακτηρίζοντας τα προϊόντα ως:

- ☞ Ασφαλή υπό τις παρούσες συνθήκες χρήσης.
- ☞ Ασφαλή υπό προϋποθέσεις.
- ☞ Μη-ασφαλή

και στη συνέχεια δημοσιεύονται από την CIR στο περιοδικό *“International Journal Of Toxicology”* .

1.3. Κατηγορίες Προϊόντων Προσωπικής Περιποίησης

Τα Προϊόντα Προσωπικής Περιποίησης ταξινομούνται στις παρακάτω κατηγορίες:

- 1) Αρωματικές ουσίες (π.χ. συνθετικές αρώματα).
- 2) Ουσίες με αντι-μικροβιακή δράση (π.χ. triclosan).
- 3) Αντιηλιακοί παράγοντες (π.χ. benzophenone).
- 4) Συντηρητικά και αντι-οξειδωτικά (π.χ. parabens).
- 5) Έντομο-απωθητικά (π.χ. DEET, N,N-diethyl-*m*-toluamide).
- 6) Πλαστικοποιητές (π.χ. φθαλικοί εστέρες).

Στην παρούσα διατριβή επικεντρώσαμε το ενδιαφέρον μας σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες, στις αρωματικές και αντιηλιακές ουσίες και στους πλαστικοποιητές. Παρακάτω θα αναλύσουμε ξεχωριστά κάθε μια κατηγορία.

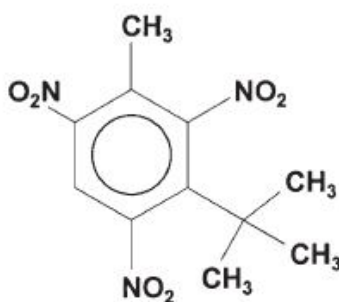
1.3.1. Συνθετικά Αρώματα

Η κατηγορία των συνθετικών αρωμάτων (*musk*) είναι από τις πιο σημαντικές στην βιομηχανία των Προϊόντων Προσωπικής Περιποίησης. Ο όρος «*musk*» προέρχεται από το θηλυκό ελάφι *Moschus moschiferus* L. και πιο συγκεκριμένα είναι προϊόν έκκρισης ενός αδένου του που εντοπίζεται ανάμεσα στην κοιλιά και τα γενετικά όργανα του ζώου [15]. Τα συνθετικά αρώματα είναι τεχνητά παρασκευάσματα που δημιουργήθηκαν για να αντικαταστήσουν το φυσικό άρωμα. Τα συνθετικά αρώματα χωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες και χρησιμοποιούνται ευρέως στα αρώματα, στα σαμπουάν, στα αποσμητικά και στα σαπούνια :

- ☞ Στις νιτρο-αρωματικές ενώσεις
- ☞ Στις πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις (PCMs)
- ☞ Στις μακροκυκλικές αρωματικές ενώσεις

Νιτρο-αρωματικές ενώσεις

Η περίοδος χρήσης των Νιτρο-αρωματικών ενώσεων ξεκίνησε τον 19^ο αιώνα με τη εφεύρεση της «*Musk-Baur*» (εικόνα 1) που πήρε το όνομα της από τον εφευρέτη της Baur [16].

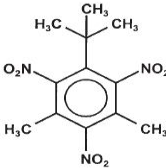
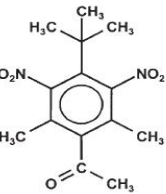
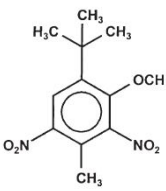
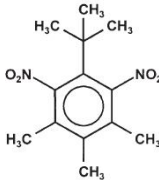
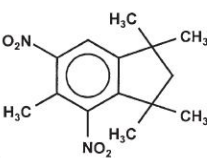


Εικόνα 1. Δομή της Musk-Baur (2-(1,1-διμεθυλαιθυλ)-4-μεθυλ-1,3,5-τρινιτρο-βενζόλιο)

Στα χρόνια που ακολούθησαν συντέθηκαν και άλλες νιτρο-αρωματικές ενώσεις οι οποίες κατάφεραν να αντικαταστήσουν το φυσικό άρωμα. Οι νιτρο-αρωματικές ενώσεις είναι παράγωγα του νιτροβενζολίου, με πλευρικές αλκυλο-, κετονο- ή μεθοξυλ- ομάδες. Οι κύριοι εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας

παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1. Για πολλά χρόνια οι νιτρο-αρωματικές ενώσεις παράγονταν σε υψηλές ποσότητες λόγω του χαμηλού κόστους τους. Το 1983 όμως η παραγωγή τους άρχισε να μειώνεται, καθώς υπήρχαν αναφορές για φωτο-αλλεργικές αντιδράσεις που προκαλούσε η νιτρο-αρωματική ένωση Ambrette, ενώ ο εντοπισμός των νιτρο-αρωματικών ενώσεων Xylene, Ketone και Ambrette, στο νερό, στα ψάρια της Ιαπωνίας [17, 18] και στον άνθρωπο [19, 20], οδήγησε στην ελάττωση της παραγωγής τους και στην ταυτόχρονη αντικατάστασή τους από τις πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις (PCMs).

Πίνακας 1.1. Νίτρο αρωματικές ενώσεις.

CAS no.	Εμπορικό όνομα	Μοριακός Τύπος	Δομή
81-15-2	Musk xylene, Musk xylol	$C_{12}H_{15}N_3O_6$	
81-14-1	Musk ketone	$C_{14}H_{18}N_2O_5$	
83-66-9	Musk ambrette	$C_{12}H_{16}N_2O_5$	
145-39-1	Musk tibetene	$C_{13}H_{18}N_2O_4$	
116-66-5	Musk moskene	$C_{14}H_{18}N_2O_4$	

Πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις (PCMs)

Οι πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις (PCMs) σε σχέση με τις νίτρο αρωματικές ενώσεις, δεν περιλαμβάνουν στο μόριο τους νιτρομάδες ($-\text{NO}_2$). Αντίθετα, αποτελούνται από δυο με τρεις δακτυλίους έχοντας ως υποκαταστάτες περισσότερες από πέντε μεθυλομάδες ($-\text{CH}_3$). Διακρίνονται σε παράγωγα της τετραλίνης ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}$), της κουμαρίνης ($\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2$), του ινδενίου (C_9H_8) καθώς και σε τρικυκλικές ενώσεις (Πίνακα 1.2). Οι PCMs είναι ανθεκτικές στο φως και σε αλκαλικό περιβάλλον. Χαρακτηρίζονται ως μη πολικές ουσίες μέτριας πτητικότητας.

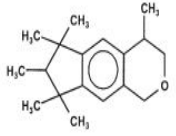
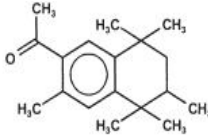
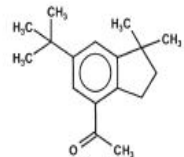
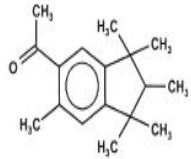
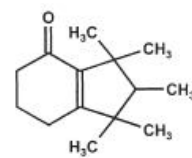
Ο μη πολικός χαρακτήρας των ενώσεων εκφράζεται από τον συντελεστή κατανομής οκτανόλης/νερού, K_{ow} (Πίνακας 1.2). Ο συντελεστής K_{ow} είναι η αναλογία της συγκέντρωσης μιας οργανικής ουσίας μεταξύ του οργανικού διαλύτη (οκτανόλης) και του νερού και πρόκειται για μια φυσική ιδιότητα που σχετίζεται πολύ καλά με τη βιολογική δραστηριότητα. Οι τιμές του λογαρίθμου K_{ow} αυξάνονται με την αύξηση της λιποφιλικότητας, ενώ αντίστροφα μειώνονται με την αύξηση της διαλυτότητας. Μεγάλες τιμές του $\log K_{ow}$ είναι χαρακτηριστικές για τις υδρόφοβες ενώσεις που συνήθως ενώνονται με το στερεό οργανικό υλικό.

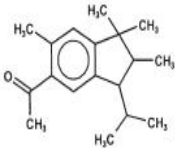
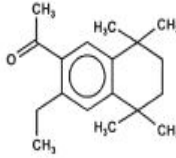
Η χρήση των πολυκυκλικών αρωματικών ενώσεων ξεκίνησε μετά το 1951 όταν συντέθηκε η πρώτη ένωση αυτής της κατηγορίας, η 6-ακετυλο-1,1,2,3,3,5-εξαμεθυλο-διυδροινδενιο (AHMI, Phantolide) [21]. Στη συνέχεια ακολούθησαν και άλλες ενώσεις με κύριους εκπροσώπους αυτής της κατηγορίας την 1,3,4,6,7,8-εξαυδρο-4,6,6,7,8,8-εξαμεθυλο-κυκλοπενταν[g]-2-βενζοπυρενιο (HHCB), την 7-ακετυλο-1,1,3,4,4,6-εξαμεθυλο-τετραυδρονάφθαλενιο (AHTN), την 4-ακετυλο-1,1-διμεθυλο-6-*tert*-βουτυλοδιυδροινδενιο (ADBI), την 5-ακετυλο-1,1,2,6-τετραμεθυλο-3-ισοποροπυλο-διυδροινδενιο (ATII) και την 7-ακετυλο-1,1,4,4-τετραμεθυλο-6-αιθυλτετραυδρονάφθαλενιο (ATTN) η παραγωγή της οποίας έχει διακοπεί από τη δεκαετία του 1980 όταν διαπιστώθηκαν οι νευροτοξικές της ιδιότητες [22]. Από τις παραπάνω ενώσεις, η HHCB έχει δυο χειρικά κέντρα, σχηματίζοντας τέσσερις στερεοϊσομερείς μορφές. Από αυτές, στην βιομηχανία των καλλυντικών

χρησιμοποιούνται μόνο τα δυο 4S στερεοϊσομερή τα οποία έχουν την χαρακτηριστική οσμή [23]. Αντίθετα η ΑΗΤΝ έχει δυο ισομερή (*S*- και *R*-), αλλά μόνο το *S*-ΑΗΤΝ έχει την χαρακτηριστική οσμή [24].

Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2000 [25], διαπιστώθηκε ότι οι πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως από την βιομηχανία των καλλυντικών είναι οι ΗΗCB και ΑΗΤΝ. Πιο συγκεκριμένα, στην Ευρώπη η παραγωγή τους έφτασε τους 1427 και 343 τόνους αντίστοιχα, έχοντας άμεσο αντίκτυπο στο περιβάλλον (επιφανειακά νερά, ιζήματα, λάσπες) αλλά και στον άνθρωπο. Αποτελέσματα ερευνών [26] έχουν δείξει ότι δρουν ως Ενδοκρινικοί Διαταράκτες. Με τον όρο *Ενδοκρινικοί Διαταράκτες* χαρακτηρίζονται οι χημικές ενώσεις που μπορούν να επηρεάσουν το ορμονικό σύστημα του ανθρώπου ή των ζώων. Η Διεύθυνση Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (U.S. Environmental Protection Agency, EPA, 1997) προτείνει ένα πιο λεπτομερή ορισμό ενδοκρινικού διαταράκτη: *Ενδοκρινικός Διαταράκτης είναι ένας εξωγενής παράγοντας που παρεμβαίνει στη σύνθεση, απέκκριση, μεταφορά, πρόσδεση, κίνηση ή εξάλειψη των φυσικών ορμονών στο σώμα και είναι υπεύθυνος για τη μεταβολή της αναπαραγωγής, της ανάπτυξης και της συμπεριφοράς*. Αυτοί ήταν και οι λόγοι για τους οποίους οι πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις επιλέχθηκαν στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή για περαιτέρω διερεύνηση.

Πίνακας 1.2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των πολυκυκλικών αρωματικών ενώσεων.

CAS no.	Εμπορικό όνομα	Χημική ονομασία	M.T. ^α	logK _{ow}	M.B. ^β g mol ⁻¹	Δομή
1222-05-5	Galaxolide* Abbalide Pearlide	1,3,4,6,7,8- εξαυδρο- 4,6,6,7,8,8- εξαμεθυλο- κυκλοπενταν [g]-2- βενζοπυρενιο (HHCB)	C ₁₈ H ₂₆ O	5.9	258.4	
1506-02-1	Tonalide* Fixolide	7-ακετυλο- 1,1,3,4,4,6- εξαμεθυλ- τετραυδροναφθαλ ενιο (AHTN)	C ₁₈ H ₂₆ O	5.7-5.8	258.4	
13171-00-1	Celestolide* Crysolide	4-ακετυλο-1,1- διμεθυλο-6-tert Βουτυλοδιυδροινδ ενιο (ADBI)	C ₁₇ H ₂₄ O	5.4	244.4	
15323-35-0	Phantolide*	6-ακετυλο- 1,1,2,3,3,5- εξαμεθυλο- διυδροινδενιο (AHMI)	C ₁₇ H ₂₄ O	5.8	244.4	
33704-61-9	Cashmeran	6,7-διυδρο- 1,1,2,3,3- πενταμεθυλο- 4(5H)ινδανονη (DPMI)	C ₁₄ H ₂₂ O	4.5	206.3	

68140-48-7	Traseolide*	5-ακετυλο-1,1,2,6- τετραμεθυλο- 3- ισοποροπυλο- διυδροινδενιο (ATII)	$C_{18}H_{26}O$	6.31	258.4	
88-29-9	Versalide	7-ακετυλο-1,1,4,4- τετραμεθυλο- 6- αιθυλτετραυδρον φθαλενιο (ATTN)	$C_{18}H_{26}O$	-	258.4	

^αΜ.Τ.= Μοριακός Τύπος

^βΜ.Β. = Μοριακό Βάρος

*οι ουσίες που επιλέχθηκαν στην παρούσα διατριβή

Μακροκυκλικές αρωματικές ενώσεις

Οι μακροκυκλικές αρωματικές ενώσεις είναι κυκλικά μακρομόρια τα οποία αποτελούνται από 15 έως 17 άτομα άνθρακα (π.χ. Habanolide, Cyclopentadecanolide, Ethylenbrassylate). Το άρωμα τους εξαρτάται από τα άτομα άνθρακα που περιλαμβάνει ο δακτύλιος και πιο συγκεκριμένα, τα 14 άτομα C προσδίνουν ελαφριά μυρωδιά ενώ αρκετά έντονο άρωμα παρατηρείται όταν υπάρχουν 15 με 16 άτομα C [27].

Στην βιομηχανία των Προϊόντων Προσωπικής Περιποίησης χρησιμοποιούνται ευρέως αλλά σε μικρές ποσότητες καθώς έχουν έντονο άρωμα και ταχεία διάσπαση ενώ είναι σταθερές στο φως και σε αλκαλικό περιβάλλον. Το βασικό μειονέκτημα όμως που παρουσιάζουν έναντι των πολυκυκλικών αρωματικών ενώσεων είναι η δύσκολη ανίχνευση και ταυτοποίηση τους στο περιβάλλον. Ο λόγος είναι οι παραπλήσιες χημικές ιδιότητες και φάσματα μάζας που έχουν οι μακροκυκλικές musks με τα λιπαρά οξέα.

1.3.2. Αντιηλιακοί Παράγοντες (φίλτρα UV)

Τα τελευταία 75 χρόνια, ενώσεις που απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία (UV), χρησιμοποιούνται ευρέως σε ποικίλα Προϊόντα Προσωπικής Περιποίησης (αντιηλιακά, σαμπουάν, κραγιόν κ.α). Μακροχρόνια, η έκθεση στην UV ακτινοβολία προκαλεί εκφυλιστικές βλάβες στα κύτταρα, στον ινώδη ιστό και στα αγγεία του δέρματος, πρόωρη γήρανση (φωτογήρανση), μελανώματα και άλλες βλάβες [28]. Η επικίνδυνη υπεριώδης ακτινοβολία (UV) διακρίνεται στις εξής περιοχές ανάλογα με το μήκος κύματος της:

☞ Την **UVA** με μήκος κύματος 320–400nm [28] που διαχωρίζεται στην UVA₂ (320-340nm) και UVA₁ (340-400nm) [29]. Τα παλιά χρόνια, υπήρχε η αντίληψη ότι η UVA ακτινοβολία δεν είχε ιδιαίτερη επίδραση στο δέρμα. Τα τελευταία χρόνια όμως αποδείχθηκε ότι συνεισφέρει τα μέγιστα στις δερματικές βλάβες. Σύμφωνα με έρευνες, διεισδύει βαθύτερα στο δέρμα, φτάνοντας μέχρι το χόριο όπου πολλές

διαδικασίες φωτο-γήρανσης λαμβάνουν χώρα. Προκαλεί έμμεσα βλάβη στο DNA, με τη δημιουργία ελευθέρων ριζών οξυγόνου εμποδίζοντας τη σύνθεση της μελανίνης, ενώ ευθύνεται και για τις θανάσιμες μορφές καρκίνου του δέρματος όπως είναι το μελάνωμα [28].

☞ Την **UVB** με μήκος κύματος 280–320nm [28]. Η UVB ακτινοβολία σε σύγκριση με την UVA, φτάνει στην επιφάνεια της γης σε μικρότερα ποσοστά (η αναλογία UVA προς UVB είναι 20:1 [29]). Βασική αιτία, είναι η απορρόφηση μεγάλου μέρους της ακτινοβολίας από τη στοιβάδα του όζοντος (O_3). Το μόριο του όζοντος έχει φωτο-απορροφητική δράση και βρίσκεται κυρίως στην στρατόσφαιρα, 10 με 50 km πάνω από την επιφάνεια της γης, απορροφώντας μεγάλο μέρος της UVB ακτινοβολίας [28]. Η ποσότητα που καταφέρνει να διαφύγει είναι αρκετή ώστε να προκαλέσει μελανώματα και άλλες μορφές καρκίνου. Έρευνες έχουν δείξει ότι η UVB ακτινοβολία προκαλεί βλάβες στη δομή του DNA είτε άμεσα με τον σχηματισμό διμερών πυριμιδίνης είτε έμμεσα με την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS – Reactive Oxygen Species) [30]. Επιπλέον, έχει βρεθεί να αναστέλλει την δράση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (π.χ. *p-53*) και να ωθεί την δράση ογκογονιδίων (π.χ. *p-16* υπεύθυνο για την εμφάνιση μελανωμάτων) [30].

☞ Την **UVC** με μήκος κύματος 180-280nm [28]. Η ακτινοβολία UVC απορροφάται εξ ολοκλήρου από τη στοιβάδα του όζοντος της στρατόσφαιρας και δεν φτάνει στην επιφάνεια της γης.

Οι βασικές μέθοδοι προστασίας από την επικίνδυνη ακτινοβολία, στηρίζονται στην αποφυγή έκθεσης στον ήλιο, στη χρήση ρούχων και κυρίως στην χρήση αντιηλιακών σκευασμάτων. Τα σύγχρονα αντιηλιακά σκευάσματα περιέχουν αντιηλιακές ουσίες, οι οποίες απορροφούν, ανακλούν ή σκεδάζουν την υπεριώδη ακτινοβολία αποτρέποντας την διείσδυση της στο δέρμα [31]. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση και τις ΗΠΑ, επιτρέπεται η χρήση συνολικά 43 ουσιών, με τη συγκέντρωσή τους στα Προϊόντα Προσωπικής Περιποίησης να κυμαίνεται από 0.1-10% (Πίνακας 1.3α και β) [32].

Πίνακας 1.3 : Οι επιτρεπόμενοι από την Ευρωπαϊκή Ένωση αντιηλιακοί παράγοντες [28].

(α) Φίλτρα – UVA και (β) Φίλτρα – UVB.

(α) Φίλτρα – UVA

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
* Benzophenone-3.	Oxybenzone, BENZ-3, Eusolex 4360, Neo Helipan BB, Uvinul M40, Escalol 567, UVA-sorb MET/C	6–10%
* 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid.	Sulisobenzene, BENZ-4, UVA-sorb S5, Escalol 577, Uvinul MS 40	5–10%
* 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic sodium salt.	Benzophenone-5, BENZ-5, sulisobenzene sodium	5–10%
* 1-(4-tert-butylphenyl)-3(4-methoxyphenyl)propane-1,3-dione.	Butyl methoxy dibenzoylmethane, avobenzene, BMDBM, Parsol 1789, Eusolex 9020	3–5%
* 2,2'-Methylene-bis-6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(tetramethylbutyl-1,1,3,3-phenol.	Methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol, MBBT, Tinosorb M	10%
* Phenol,2-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-methyl-6[2-methyl-3-[1,3,3,3-tetramethyl-1-[(trimethylsilyl)oxy]disiloxanyl]propyl.	Drometrizole trisiloxane, DTS, Mexoryl XL	10%
* 2,2'-(1,4-Phenylene)bis-(1-H-enzimidazole-4,6-disulfonic acid, monosodium salt.	Disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulfonate, bisimidazylate, DPDT, Neoheliopan AP	10%
* Terephthalylidene dicamphor sulfonic acid.	Ecamsule, TDSA, Mexoryl SX	10%
* 4,4-((6-(((1,1-dimethylethyl)amino)carbonyl)phenyl)amino)-1,3,5-triazine-2,4-diyl)diimino)bis-,bis(2-ethylhexyl)ester).	Diethylhexyl butamido triazone, DBT, UVA-sorb HEB	10%
* Dimethico-diethylbenzalmalonate.	DDBM, Parsol SLX	10%

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
✱ (1,3,5)-Triazine-2,4-bis((4-(2-ethylhexyloxy)-2-hydroxy)-phenyl)-6-(4-methoxyphenyl).	Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenol triazine, bemotrizinol, BEMT, Tinosorb S	10%
✱ TiO ₂ και ZnO.	Ανάλογα με το μέγεθος του κόκκου	

(β) Φίλτρα – UVB

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
✱ 4-Aminobenzoic acid.	PABA	5%
✱ Padimate O .	2-Ethylhexyl 4-dimethylaminobenzoate, (octyldimethyl PABA, ED-PABA (OD-PABA))	8%
✱ Ethoxylated ethyl 4-benzoic acid.	PEG-PABA, Uvinul P25, Unipabol U17	10%
✱ 2,4,6-Trianiino-(p-carbo-2'-ethylhexyl-1'-oxy)-1,3,5-triazine.	Octyl triazone,ethylhexyl triazone, ET, Uvinul T150	5%
✱ Ethylhexyl methoxycinnamate.	Octyl methoxycinnamate, (EMC, OMC, Escalol 557, Eusolex 2292, Neo Heliopan AV, Parsol, MCX)	7.5-10%
✱ Isopentenyl-4-methoxycinnamate.	Isoamyl 4-methoxycinnamate (IMC, Neo Heliopan E1000)	10%
✱ 2-Ethylhexyl salicylate.	Octyl salicylate, octisalate, ES, (OS), Escalol 587, Neo Helipan OS	5%
✱ Homosalate.	Homomethyl salicylate, HMS	10%
✱ Benzylidene camphor sulfonic acid.	BCSA, Mexoryl SD-20, Unisol-S22	6%
✱ Polymer of N-[(2 and 4)-[(2-oxoborn-3-ylidene) methyl] benzyl] acrylamide.	Polyacrylamidomethyl benzylidene camphor, PBC, Mexoryl SW	6%
✱ N,N,N-Trimethyl-4-(2-oxoborn-3-ylidenemethyl)anilinium methyl sulphate.	Camphor benzalkonium methosulfate, CBM, Mexoryl SK	6%

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
* 3-(4'- Methylbenzylidene)-d-1 camphor.	4-Methylbenzylidene camphor, MBC, Eusolex 6300, Neo Helipan MBC	4%
* 3-Benzylidene camphor.	3-Benzylidene camphor, BC, Mexoryl SD-20, Unisol-S-22	2%
* 2-cyano-3,3-diphenyl acrylic acid.	2-ethyl hexyl ester, octocrylene, 2-ethylhexyl-2-cyano-3,3 diphenylacrylate, Eusolex OCR, Neo Helipan 303	10%
* 2- Phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid and its potassium, sodium and triethanolamine salts.	Phenylbenzimidazole sulfonic acid, PBSA, ensulizole, Eusolex 232, Neo Heliopan Hydro, Parsol HS	4-8%

Τα αντιηλιακά φίλτρα αναπτύχθηκαν αρχικά για να προστατεύουν από την υπεριώδη UVB ακτινοβολία. Τα σύγχρονα αντιηλιακά σκευάσματα όμως, χαρακτηρίζονται από ένα ευρύ φάσμα προστασίας που καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος του υπεριώδους φάσματος (UVA και UVB). Οι δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ως συστατικά των αντιηλιακών ονομάζονται **αντιηλιακοί παράγοντες (φίλτρα UV)**. Οι ουσίες αυτές για να λάβουν άδεια έγκρισης από τους Εθνικούς Οργανισμούς Φαρμάκων υπόκεινται σε πολυετείς και άριστα τεκμηριωμένες δοκιμές. Οι μεγάλες ποσότητες που χρησιμοποιούνται στην επιφάνεια του δέρματος καθώς και η ενδεχόμενη αλληλεπίδραση τους με άλλα συστατικά των αντιηλιακών σκευασμάτων είναι οι κύριοι λόγοι ελέγχου. Οι μελέτες που λαμβάνουν χώρα είναι ο προσδιορισμός της αλλεργιογόνου δράσης τους, τα προϊόντα φωτοδιάσπασης, η τοξικότητα καθώς και η πρόκληση καρκινογένεσης μετά από μακροχρόνια χρήση.

Οι δραστικές ουσίες διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους:

i. **Οργανικές ενώσεις ή χημικά φίλτρα (26 ενώσεις):** Οι ουσίες αυτές είναι άχρωμες, αρωματικές ενώσεις που απορροφούν την επικίνδυνη UV ακτινοβολία. Ο μηχανισμός δράσης τους βασίζεται στην απορροφούμενη UV ακτινοβολία, η οποία ενεργοποιεί τα μόρια της ουσίας, τα οποία μεταβαίνουν από την βασική στη διεγερμένη κατάσταση. Στη συνέχεια, επιστρέφουν στην αρχική τους ενεργειακή κατάσταση, απελευθερώνοντας την περίσσεια της ενέργειας ως ακτινοβολία χαμηλότερης ενέργειας (υψηλότερου μήκους κύματος), παρεμποδίζοντας στις επικίνδυνες ακτίνες UV να εισχωρήσουν στο δέρμα [28]. Κύριοι εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας είναι το *p*-methoxycinnamate (EMC), salicylates και para-aminobenzoic acid (PABA) [28]. Τα χημικά φίλτρα, όπως ονομάζονται οι οργανικές αυτές ενώσεις, είναι αρκετά αποτελεσματικά και ασφαλή. Ωστόσο, σύμφωνα με έρευνες, η παρατεταμένη χρήση χημικών φίλτρων με λιπόφιλο χαρακτήρα (απορροφώνται επιδερμικά) ενδέχεται να προκαλούν ερεθισμούς και αλλεργίες. Για να αποφευχθούν τέτοιου είδους προβλήματα, έχει αναπτυχθεί η μέθοδος της encapsulation. Στόχος της μεθόδου είναι η μείωση του ποσοστού απορρόφησης των αντιηλιακών παραγόντων από την επιδερμίδα. Σύμφωνα με την μέθοδο, το οργανικό φίλτρο παγιδεύεται μέσα σε μια κάψουλα σιλικόνης (διαμέτρου 1μm), μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την πιθανότητα αλλεργικής αντίδρασης ή ερεθισμού. Το κύριο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι το υψηλό κόστος, εμποδίζοντας την εφαρμογή της από την πλειοψηφία των εταιριών αντιηλιακών προϊόντων [30].

ii. **Ανόργανες ενώσεις (φυσικά φίλτρα).** Τα φυσικά φίλτρα, όπως ονομάζονται οι ανόργανες αυτές ουσίες, είναι τα λεγόμενα αντιηλιακά πλήρους φάσματος, καθώς προστατεύουν από το ορατό φως, την UVA, UVB και την υπέρυθρη ακτινοβολία. Οι ουσίες αυτές είναι σταθερές στο φως, ενώ δεν αντιδρούν με τα χημικά φίλτρα. Ο τρόπος δράσης τους βασίζεται στην ικανότητα τους να αντανακλούν και στη συνέχεια να διαχέουν την UV ακτινοβολία. Βασικό μειονέκτημα τους είναι η αδιαφανής φύση τους, αφήνοντας ένα λευκό παχύρρευστο στρώμα

κρέμας όταν εφαρμοστούν στο δέρμα. Για να βελτιωθεί η όψη τους και να είναι αποδεκτά από τις εταιρίες καλλυντικών, υπόκεινται σε μικρομοριακή επεξεργασία (micronization), όπου το μέγεθος τους μειώνεται από τα 200-500 nm στα 10-50 nm. Στη νέα μορφή τους όμως περιορίζεται η ικανότητα τους να διαχέουν και κατά συνέπεια να προστατεύουν από την UV ακτινοβολία και το ορατό φως.

Κύριοι εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας είναι το TiO_2 και το ZnO . Τα τελευταία χρόνια, έχει διαπιστωθεί ότι το ZnO είναι περισσότερο αποτελεσματικό από το TiO_2 , αυξάνοντας την χρήση του. Έχει βρεθεί να είναι σταθερό στο φως, περισσότερο αποτελεσματικό στην UVA ακτινοβολία και δεν αλληλεπιδρά με τα χημικά συστατικά των αντιηλιακών [29]. Μέχρι σήμερα, έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, τόσο in-vivo όσο και in-vitro, δεν έχουν δείξει να υπάρχουν ερεθισμοί ή άλλες παρενέργειες από την χρήση TiO_2 ή ZnO . Εν κατακλείδι, τα φυσικά φίλτρα είναι πιο ασφαλή και φιλικά προς το δέρμα από τα χημικά γιατί δεν απορροφώνται διαδερμικά καθιστώντας τα κατάλληλα για την παιδική και ευαίσθητη επιδερμίδα [28].

Στο σημείο αυτό, αξίζει να αναφερθούμε στην μέθοδο εκτίμησης της αποτελεσματικότητας ενός αντιηλιακού σκευάσματος που εκφράζεται με το **Δείκτη Ηλιακής Προστασίας (SPF)**. Ως **Δείκτης Ηλιακής Προστασίας** ορίζεται ο λόγος της ελάχιστης ακτινοβολίας που μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό, σε δέρμα στο οποίο έχει τοποθετηθεί αντιηλιακό προϊόν (MED - Minimal Erythema Dose) προς την ελάχιστη ποσότητα ακτινοβολίας, που ενδέχεται να προκαλέσει ερεθισμό στο ίδιο δέρμα, χωρίς αντιηλιακή προστασία [29] (σχέση 1):

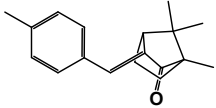
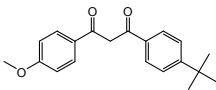
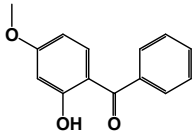
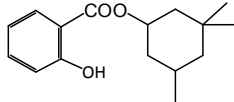
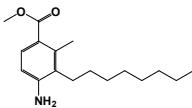
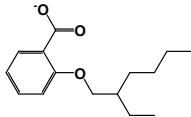
$$\text{SPF} = \frac{\text{MED προστατευμένου δέρματος}}{\text{MED μη προστατευμένου δέρματος}} \quad (1)$$

Πρακτικά, ο δείκτης αυτός προσδιορίζει την αναλογία ανάμεσα στο χρόνο έκθεσης του δέρματος στη υπεριώδη ακτινοβολία, που απαιτείται για τη πρόκληση

ερεθισμού με αντιηλιακό και στο χρόνο έκθεσης που προκαλεί τον ίδιο ερεθισμό στο δέρμα χωρίς αυτό. Δηλαδή: αν σε ένα άτομο προκληθεί ερεθισμός μετά από 20 λεπτά παραμονής στον ήλιο χωρίς αντιηλιακό, με την χρήση ενός προϊόντος με SPF 8, θα αναπτύσσει τον ίδιο ερεθισμό μετά από $8 \times 20 = 160$ λεπτά (περίπου 3 ώρες). Αυτό ισχύει με την προϋπόθεση ότι το προϊόν παραμένει αναλλοίωτο από το νερό ή τον ιδρώτα.

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει υπάρχει σημαντικός αριθμός οργανικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται στα αντιηλιακά σκευάσματα προστατεύοντας από την UVA και UVB ακτινοβολία. Στον Πίνακα 1.4 παραθέτουμε τις επιλεγμένες για τη διατριβή ουσίες με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους. Οι ουσίες αυτές επιλέχθηκαν και από τις δυο κατηγορίες αντιηλιακών παραγόντων με βάση την επικινδυνότητα τους, την ευρεία χρήση τους, την ύπαρξη τους στο περιβάλλον. Κοινό χαρακτηριστικό των επιλεγμένων αντιηλιακών παραγόντων είναι η ύπαρξη αρωματικού δακτυλίου με πλευρική αλυσίδα.

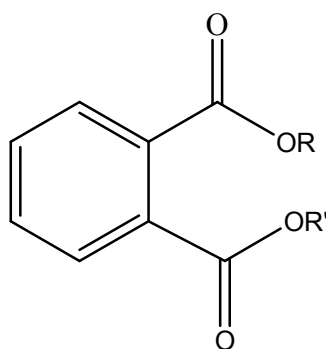
Πίνακας 1.4. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των επιλεγμένων αντηλιακών παραγόντων (φίλτρα UV)

Εμπορική Ονομασία	LogK _{ow} ^a	M.B. g mol ⁻¹	Διαλυτότητα (mg L ⁻¹)	Μοριακός Τύπος	Δομή
E6300 (UVB)	4.95	254.4	0.57	C ₁₈ H ₂₂ O	
E9020 (UVA)	4.51	310.4	1.52	C ₂₀ H ₂₂ O ₃	
E4360 (UVA)	3.52	228.2	68.56	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	
HMS (UVB)	6.16	262.3	0.02	C ₁₆ H ₂₂ O ₃	
OD-PABA (UVB)	6.15	277.4	0.0021	C ₁₇ H ₂₇ NO ₂	
Octylsalicylate (OS) (UVB)	5.97	249.3	0.028	C ₁₅ H ₂₁ O ₃	

^a: log K_{ow} = συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερό

1.3.3. Φθαλικοί Εστέρες (PAEs)

Οι φθαλικοί εστέρες (PAEs) ή εστέρες του φθαλικού οξέος είναι μια ομάδα χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται ως πλαστικοποιητές σε εκατοντάδες προϊόντα αυξάνοντας την ευλυγισία τους (π.χ. παιχνίδια, απορρυπαντικά, συσκευασίες τροφίμων, φαρμακευτικών προϊόντων, σωλήνες) καθώς και σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας (π.χ. αρώματα, βερνίκια νυχιών, σπρέι μαλλιών, σαπούνια, σαμπουάν) [33]. Ο όρος "φθαλικός" προέρχεται από το φθαλικό οξύ και είναι ενώσεις που εμφανίζουν μικρή διαλυτότητα στο νερό, υψηλή διαλυτότητα σε έλαια και χαμηλή πτητικότητα [34]. Οι πολικές καρβοξυλικές ομάδες (Εικόνα 2) συνεισφέρουν λίγο στις φυσικοχημικές ιδιότητες των φθαλικών ενώσεων, εκτός εάν οι ομάδες R και R' είναι πολύ μικρές (π.χ. μεθυλ- ή αιθυλ- ομάδες) [34].



Εικόνα 2 : Δομή του φθαλικού εστέρα

Οι φθαλικοί εστέρες που βρίσκουν ευρύτατη εμπορική εφαρμογή παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 1.5, που παρατίθεται παρακάτω.

Πίνακας 1.5: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των φθαλικών εστέρων.

Όνομα	M.B. g/mol	logK _{ow}	Διαλυτότητα mg L ⁻¹ (νερό 25°C)	Μοριακός Τύπος	Δομή
Διμεθυλοφθαλικός (DMP)	194.2	1.6	5220	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	
Διαιθυλοφθαλικός (DEP)	222.2	2.5	1000	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	
Δι- <i>n</i> -βουτυλοφθαλικός (DnBP)	278.3	4.5	13	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	
Βουτυλοβενζυλοφθαλικός (BBP)*	312.3	4.9	0.7	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	
Δι-(2-αιθυλεξυλο) φθαλικός (DEHP)	390.6	7.5	0.3	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	
Δι- <i>n</i> -οκτυλοφθαλικός (DnOP)*	390.5	8.1	3.0	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	

* Οι ουσίες αυτές επιλέχθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Όπως αναφέραμε και παραπάνω οι φθαλικοί εστέρες παρουσιάζουν υψηλή διαλυτότητα στα έλαια και μικρή στο νερό. Η διαλυτότητα τους στο νερό εξαρτάται από το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας, πιο συγκεκριμένα αύξηση του μήκους της αλυσίδας προκαλεί μείωση της διαλυτότητας (από 0.3 έως 5220 mg L⁻¹, Πίνακας 1.5).

Σύμφωνα με τον Ellington [35] η συμπεριφορά αυτή των PAEs πιθανόν να οφείλεται σε περιστροφή και αναδίπλωση της αλυσίδας μέσα στο υδατικό διάλυμα, μειώνοντας την ενέργεια του συστήματος. Έχει βρεθεί ότι όσο αυξάνεται το μήκος της αλκυλο αλυσίδας των φθαλικών εστέρων, η τιμή $\log K_{ow}$ αυξάνεται υποδηλώνοντας αύξηση της λιποφιλικότητας [36].

Οι φθαλικοί εστέρες μπορούν εύκολα να διαφύγουν στο περιβάλλον κατά την παραγωγή ή τη χρήση τους. Η παγκόσμια παραγωγή τους υπολογίζεται στους 4.200.000 τόνους ετησίως, η οποία έχει αυξηθεί πάνω από 50% τα τελευταία 20 χρόνια [37]. Από όλους τους φθαλικούς εστέρες, ο DEHP είναι ο περισσότερος διαδεδομένος στο περιβάλλον (αποτελεί το 1/3 της Ευρωπαϊκής παραγωγής). Εξαιτίας των υψηλών, σχετικά, τάσεων ατμών, οι φθαλικοί εστέρες πτητικοποιούνται εύκολα, διαχέονται στην ατμόσφαιρα, παγιδεύονται σε μάζες νεφών και καταλήγουν, λόγω βροχοπτώσεων, στους υδάτινους αποδέκτες και το έδαφος [38]. Έτσι, σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε περιβαλλοντικά δείγματα (αστικά λύματα, ατμοσφαιρικό αέρα, επιφανειακά ύδατα, έδαφος και υδρόβιους οργανισμούς) έχουν ανιχνευθεί υψηλές συγκεντρώσεις φθαλικών εστέρων [39]. Οι συγκεντρώσεις τους κυμαίνονται από 0.3 έως 77.0 ng m⁻³ σε ατμοσφαιρικά δείγματα, από 0.3 έως 98.0 μg L⁻¹ σε επιφανειακά ύδατα, 0.2 έως 8.4 mg Kg⁻¹ d.w. σε δείγματα εδάφους και 28 έως 154 mg Kg⁻¹ d.w. στην ιλύ.

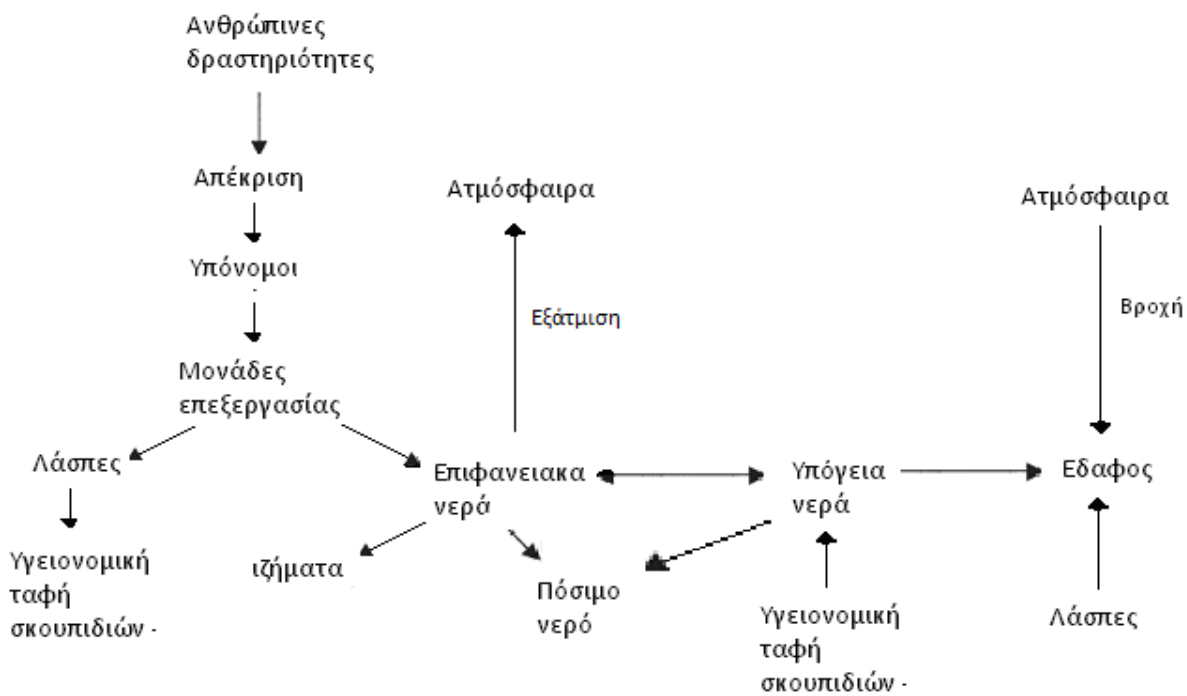
Η Υπηρεσία Περιβαλλοντικής Προστασίας των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (United States Environmental Protection, USEPA) καθώς και άλλοι διεθνείς οργανισμοί έχουν κατατάξει τους φθαλικούς εστέρες ως βασικές ενώσεις που ρυπαίνουν το περιβάλλον. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ζώα, απέδειξαν ότι οι φθαλικοί εστέρες μπορούν να δράσουν ως *Ενδοκρινικοί Διαταράκτες* παρεμβαίνοντας στην ομαλή λειτουργία του ορμονικού συστήματος, μιμούμενοι την δράση των ορμονών. Οι φθαλικοί εστέρες θεωρούνται υπεύθυνοι για αρκετές ασθένειες στον άνθρωπο όπως είναι η δυσλειτουργία του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος, ο καρκίνος του στήθους και των γεννητικών οργάνων,

η εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος [40]. Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει απαγορεύσει τη χρήση των DEHP και DBP στα καλλυντικά ενώ έχει ορίσει αυστηρά όρια για τους DEHP και DINP στα υλικά που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα όπως είναι για παράδειγμα τα υλικά συσκευασίας.

Οι φθαλικοί εστέρες που επιλέχθηκαν για περαιτέρω διερεύνηση στην παρούσα Διατριβή, ήταν οι BBP και DnOP, καθώς χρησιμοποιούνται σε αρκετά Προϊόντα Προσωπικής Περιποίησης. Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι ο DEHP, παρότι είναι ο περισσότερο διαδεδομένος φθαλικός εστέρας, αποκλείστηκε από την παρούσα εργασία, διότι ήταν παρόν σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας, επιμολύνοντας τα σκεύη και παρέχοντας ψευδή αποτελέσματα.

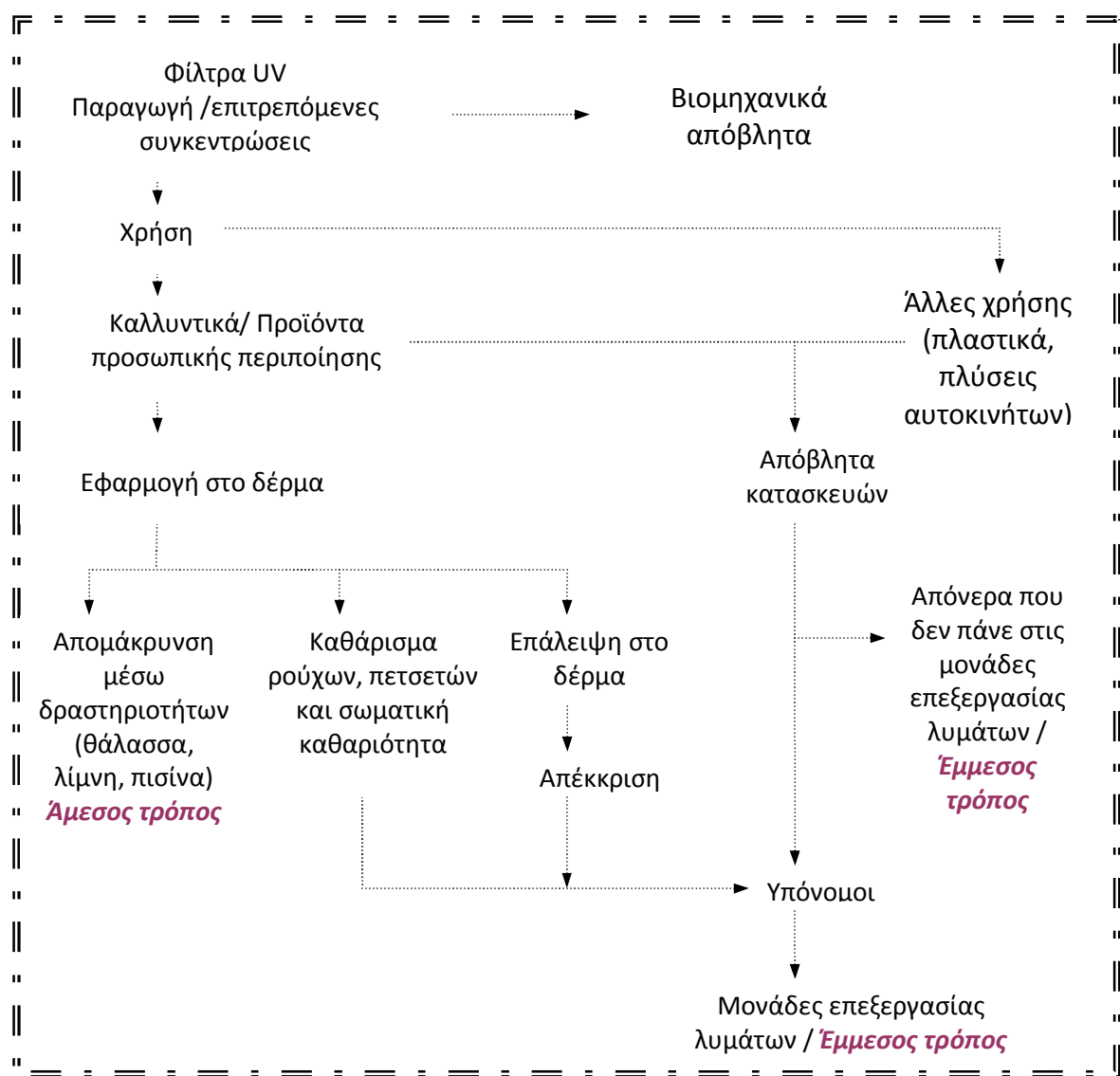
1.4. Προϊόντα Προσωπικής Περιποίησης Και Περιβάλλον

Τα προϊόντα προσωπικής περιποίησης είναι μια νέα κατηγορία περιβαλλοντικών ρυπαντών που έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον των επιστημών. Ένα μεγάλο ποσοστό των ρύπων που καταλήγουν στα υπόγεια αλλά και στα επιφανειακά νερά προέρχεται από τα νοικοκυριά: απορρυπαντικά, καθαριστικά σπιτιού, μέσα καθαρισμού και περιποίησης του σώματος (σαμπουάν, αφρόλουτρα), αποσμητικά, χρώματα, διαλύτες, φαρμακευτικά και ιατρικά προϊόντα. Στο σχήμα 1 παρουσιάζονται οι κύριοι τρόποι διείσδυσης τους στο περιβάλλον.



Σχήμα 1: Τρόποι διείσδυσης των Προϊόντων Προσωπικής Περιποίησης στο περιβάλλον.

Οι αντιηλιακοί παράγοντες απελευθερώνονται στο περιβάλλον με δυο τρόπους: τον **έμμεσο** μέσω των μονάδων επεξεργασίας λυμάτων και τον **άμεσο** από τα βιομηχανικά απόβλητα, το κολύμπι σε θάλασσες και πισίνες κ.α. [41]. Στο σχήμα 2 παρουσιάζονται οι κύριες αρτηρίες διεισδύσεις των αντιηλιακών παραγόντων στο περιβάλλον.



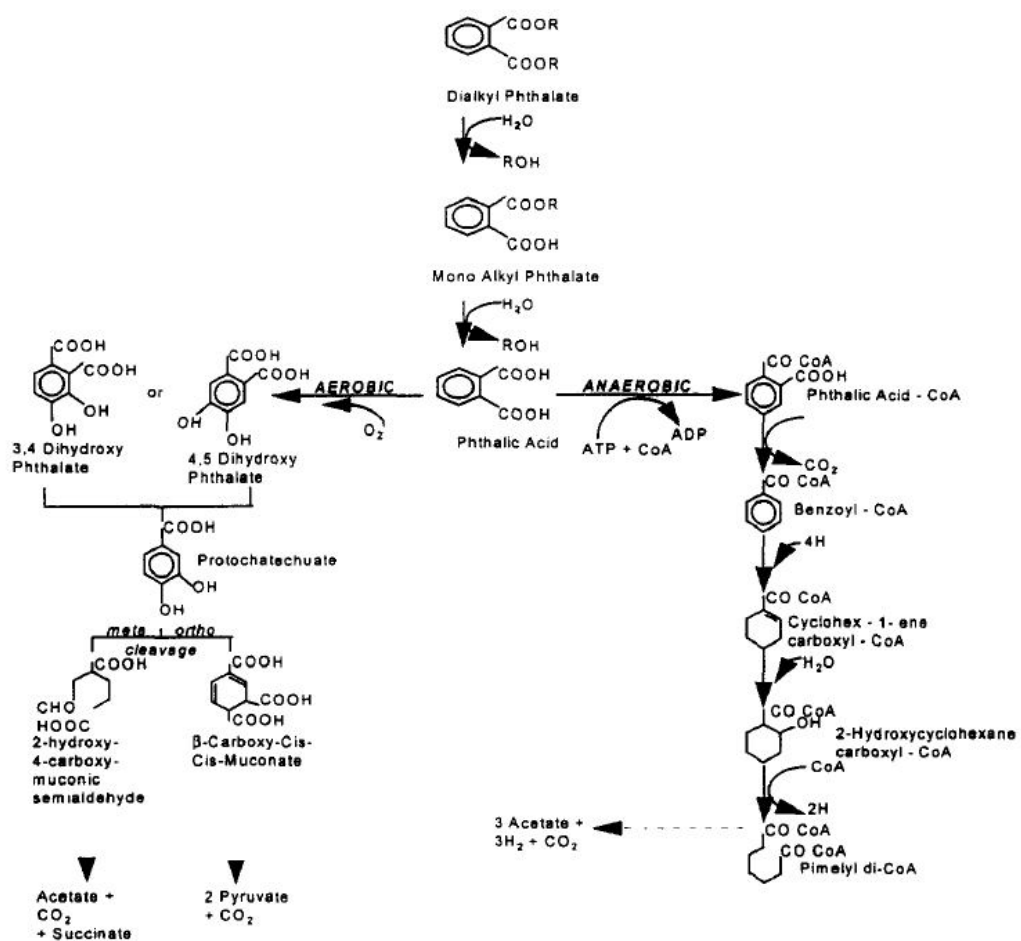
Σχήμα 2: Κύριοι τρόποι διείσδυσης των αντιηλιακών παραγόντων στο περιβάλλον [42].

Οι φθαλικοί εστέρες απελευθερώνονται στο περιβάλλον και στην ατμόσφαιρα, κατά τη διάρκεια παράγωγης και χρήσης τους. Ο κύριος λόγος είναι ότι δε σχηματίζουν ομοιοπολικό δεσμό με τις ενώσεις που συνδέονται, καθιστώντας εύκολο τον αποχωρισμό τους [43]. Οι φθαλικοί εστέρες αποδομούνται στο περιβάλλον με δυο τρόπους:

👉 την αβιοτική αποδόμηση που αποτελείται από την χημική υδρόλυση και την φωτόλυση [34]. Οι φθαλικοί εστέρες υδρολύονται με αργούς ρυθμούς με τα

προϊόντα υδρόλυσης είναι ένα οξύ και μια αλκοόλη. Μπορούν να υποβληθούν σε δυο στάδια υδρόλυσης, παράγοντας αρχικά το μονοεστέρα και μια ελεύθερη αλκοόλη, ενώ στο δεύτερο στάδιο σχηματίζεται το φθαλικό οξύ και μια δεύτερη αλκοόλη. Η υδρόλυση των εστέρων μπορεί να καταλύεται από μια βάση ή ένα οξύ. Οι φθαλικοί εστέρες υδρολύονται σε αμελητέο βαθμό σε ουδέτερο pH, ενώ είναι δυνατή η όξινη υδρόλυση των εστέρων, η οποία μπορεί να είναι τέσσερις φορές πιο αργή σε σχέση με τη βασική υδρόλυση [34]. Η φωτόλυση των φθαλικών εστέρων μπορεί να πραγματοποιηθεί με δυο τρόπους. Είτε μέσω απευθείας απορρόφησης της UV ακτινοβολίας από την ένωση, είτε μέσω της απορρόφησης της UV ακτινοβολίας από το νερό με σχηματισμό ενεργών ειδών π.χ. ρίζες υδροξυλίου και τα οποία θα αντιδράσουν με τους φθαλικούς εστέρες. Η αντίδραση με τις ρίζες υδροξυλίου είναι ο πιο σημαντικός μηχανισμός φωτοαποδόμησής τους στην ατμόσφαιρα.

✌ την βιοαποδόμηση που θεωρείται και ο κυριότερος μηχανισμός αποδόμησης των φθαλικών εστέρων στο περιβάλλον αφού ο ρυθμός της φωτόλυσης και της χημικής υδρόλυσης είναι αρκετά χαμηλός [44]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι φθαλικοί εστέρες βιοαποδομούνται από ένα μεγάλο αριθμό βακτηρίων και ακτινομυκήτων υπό αερόβιες αλλά και αναερόβιες συνθήκες [45, 46, 47]. Η διαδικασία της αναερόβιας βιοαποδόμησης εξαρτάται από το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας [44, 48]. Πιο συγκεκριμένα, οι φθαλικοί εστέρες (π.χ. DEEP, DnOP) με αριθμό ατόμων C στην αλκυλική αλυσίδα μεγαλύτερο από 8 καθίστανται περισσότερο ανθεκτικοί (αποδομούνται με μικρότερο ρυθμό) από φθαλικούς εστέρες με μικρότερο αριθμό ανθράκων (π.χ. DMP, DEP). Στο σχήμα 3 παρουσιάζεται η διαδικασία βιοαποδόμησης των φθαλικών εστέρων στο περιβάλλον.



Σχήμα 3: Διαδικασία βιοαποδόμησης των φθαλικών εστέρων στο περιβάλλον [44].

1.4.1. Οικιακά Και Αστικά Λύματα

Ο όρος **λύματα** έχει διττή σημασία, αρχικά αναφέρεται στα υγρά απόβλητα από τις κατοικίες που ονομάζονται **οικιακά λύματα** και εν συνεχεία στα υγρά απόβλητα από τις συνήθειες δραστηριότητες μιας πόλης που ονομάζονται **αστικά λύματα**. Τα οικιακά λύματα παράγονται από τις ανάγκες των ανθρώπων όπως η αφόδευση, η χρήση του μπάνιου, η προετοιμασία του φαγητού κ.α. και απελευθερώνονται στο περιβάλλον διαμέσου του αποχετευτικού συστήματος. Κατά μέσο όρο παράγονται 180 - 300 λίτρα ανά άτομο κάθε ημέρα. Έτσι δεν μας εκπλήσσει το γεγονός ότι η υψηλότερη συγκέντρωση των προς ανάλυση ουσιών ανιχνεύεται στα ανεπεξέργαστα λύματα και ιδιαίτερα στην είσοδο των λυμάτων.

Πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις

Στην περίπτωση των πολυκυκλικών αρωματικών ενώσεων, οι περισσότεροι διαδεδομένες είναι οι ΑΗΤΝ, ΗΗCB. Οι προαναφερθείσες, εισέρχονται στις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων (Μ.Ε.Λ.) μέσω του συστήματος αποχέτευσης. Στα επεξεργασμένα λύματα η συγκέντρωσή τους μειώνεται δραστικά και αυτό οφείλεται στην προσρόφηση τους από την ενεργή ιλύ και στην αποικοδόμηση τους σε πολικούς μεταβολίτες [15]. Η όλη διαδικασία ενδέχεται να είναι ατελής εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων των πολυκυκλικών αρωματικών ενώσεων μέσα στις μονάδες αλλά και λόγω της χαμηλής ικανότητας τους να αποικοδομούνται [49, 50]. Αυτό επιβεβαιώνεται από τα βιβλιογραφικά δεδομένα όπου οι ουσίες ανιχνεύτηκαν τόσο στην είσοδο όσο και στην έξοδο. Ενδεικτικά, αναφέρουμε τις συγκεντρώσεις που ανιχνεύτηκαν στην έξοδο των ΜΕΛ: ΗΗCB 297 - 1680 ng L⁻¹ [49, 50, 51, 52], ΑΗΤΝ 86 - 5410 ng L⁻¹ [49, 50, 51, 52], ΑDBI 20-620 ng L⁻¹ [50, 52], ΑΤII 15-30 ng L⁻¹ [50], DPMI 1.97 μg L⁻¹ [52]. Στην περίπτωση της ενεργούς ιλύς, η προσρόφηση των ουσιών οφείλεται στον λιπόφιλο χαρακτήρα τους ($\log K_{ow} = 4.5-6.31$) [50]. Σε τιμές $\log K_{ow}$ που βρίσκονται κάτω από 4, η αφαίρεση των συνθετικών οργανικών ενώσεων κατά τη διάρκεια της πρωτοβάθμιας επεξεργασίας εξαρτάται από την πτητικοποίηση των διαλυτών ενώσεων, ενώ σε τιμές πάνω από 4 ο κύριος μηχανισμός αφαίρεσης των ουσιών είναι η προσρόφηση στην καθιζάνουσα ιλύ. Ενδεικτικά αναφέρουμε για την ΗΗCB 0.104- 108 mg kg⁻¹ dry wt και για την ΑΗΤΝ 0.0349 – 16 mg kg⁻¹ dry wt [50, 53, 54, 55, 56, 57, 58]. Οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται στις τιμές των συγκεντρώσεων οφείλονται στους παρακάτω παράγοντες [59]:

- ≈ στο μέγεθος των μονάδων επεξεργασίας,
- ≈ στον όγκο των λυμάτων που εισέρχονται καθημερινά,
- ≈ στο είδος των αποβλήτων (οικιακά, βιομηχανικά ή εμπορικά),
- ≈ στις μεθόδους επεξεργασίας, που εφαρμόζονται στις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων.

Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές ερευνητικές εργασίες για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των πολυκυκλικών αρωματικών ενώσεων τόσο στο περιβάλλον όσο και στους υδρόβιους ζώντες οργανισμούς με πλήθος αναλυτικών μεθόδων όπως παρουσιάζεται αναλυτικά στον Πίνακα 1.6.

Αντιηλιακοί Παράγοντες

Οι αντιηλιακοί παράγοντες (φίλτρα UV), έχουν την τάση να προσροφώνται από την ενεργή ιλύς λόγω της μη πολικής φύσης τους ($\log K_{ow}$ από 3.52 έως 6.16) και να αποικοδομούνται [60]. Η συγκέντρωσή τους στις Μονάδες Επεξεργασίας Λυμάτων ποικίλει και εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν, όπως αναφέραμε και στην περίπτωση των PCMs. Ενδεικτικά, στην έξοδο των μονάδων οι συγκεντρώσεις που έχουν αναφερθεί για το E4360 είναι 45–7800 ng L⁻¹ [61, 62, 63], ενώ για το E6300 είναι 62 ng L⁻¹ [61]. Στην ενεργή ιλύ έχουν αναφερθεί για το E6300 από 150 έως 4980 μg kg⁻¹ dry wt [64], για το E4360 10 μg kg⁻¹ dry wt [65]. Στον Πίνακα 1.7 παρουσιάζονται οι αναλυτικές μέθοδοι που έχουν εφαρμοστεί.

Φθαλικοί εστέρες

Στις Μ.Ε.Λ. οι φθαλικοί εστέρες συσσωρεύονται μέσω των οικιακών και βιομηχανικών αποβλήτων καθώς και με τον “κύκλο της βροχής”. Οι φθαλικοί εστέρες προσροφώνται στην ενεργό ιλύ λόγω της χαμηλής διαλυτότητας τους στο νερό καθώς και του υψηλού συντελεστή κατανομής οκτανόλης/νερό ($\log K_{ow}$). Οι περισσότεροι διαδεδομένοι φθαλικοί εστέρες είναι οι DEHP, BBP και ο DnOP [43]. Οι συγκεντρώσεις τους στην έξοδο των Μ.Ε.Λ. κυμαίνεται από 0.01 έως 1.99 μg L⁻¹ για το BBP [38, 43, 66] και 0.1 έως 10 μg L⁻¹ για το DnOP [67] ενώ στην ενεργή ιλύς από 0.001 έως 2.52 mg kg⁻¹ dw (dry weight) για το BBP [43, 68, 69]. Πλήθος αναλυτικών μεθόδων έχουν εφαρμοστεί για την ανάλυσή τους όπως παρουσιάζεται στον συγκεντρωτικό Πίνακα 1.8.

1.4.2. Επιφανειακά Και Υπόγεια Ύδατα, Θαλασσινό Και Πόσιμο Νερό

Πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις

Οι πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις έχουν ανιχνευτεί σε ποτάμια, σε λίμνες, σε εκβολές ποταμών αλλά και στο θαλασσινό νερό. Οι περισσότερες διαδεδομένες είναι οι HHCB και AHTN με τις συγκεντρώσεις τους να κυμαίνονται για τα λιμναία νερά από: 2-70 ng L⁻¹ [51, 70, 71, 72] και 1-20 ng L⁻¹ [51, 70, 71, 72], αντίστοιχα. Για το θαλασσινό νερό από: <2 ng L⁻¹ για το HHCB και < 1 ng L⁻¹ για το AHTN [70]. Για τα νερά ποταμών από: 20–117 ng L⁻¹ [51, 73, 74] και 8-20 ng L⁻¹ [51, 74], αντίστοιχα. Για το πόσιμο από 7.8 ng L⁻¹ και 5.6 ng L⁻¹ για τις HHCB και AHTN [71], αντίστοιχα ενώ για τις πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις: ATII από 0.11 ng L⁻¹ [72], ADBI από 0.029 ng L⁻¹ [72], AHMI από 0.52 ng L⁻¹ [72]. Οι αναλυτικές μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί αναφέρονται στον Πίνακα 1.6.

Αντιηλιακοί Παράγοντες

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει οι αντιηλιακοί παράγοντες εισέρχονται στο υδάτινο περιβάλλον άμεσα είτε έμμεσα. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις έχουν καταγραφεί την καλοκαιρινή περίοδο, όπου οι δραστηριότητες είναι εντονότερες. Οι περισσότεροι διαδεδομένοι αντιηλιακοί παράγοντες είναι τα E4360, E6300, OD-PABA και EHMS. Για το E6300 οι συγκεντρώσεις που έχουν ανιχνευτεί στα λιμναία νερά κυμαίνονται από 2-28 ng L⁻¹ [75, 76], για το E4360 από 2-85 ng L⁻¹ [41, 75, 76] και για το OD-PABA από 24-34 ng L⁻¹ [41]. Στα νερά ποταμών: από 27-114 ng L⁻¹ για το E4360 [41, 77, 78] από 165-345 ng L⁻¹ για το EHMS [41] ενώ για το OD-PABA στα 47 ng L⁻¹ [41]. Στο πόσιμο νερό έχουν ανιχνευτεί τα: E6300 στα 18 ng L⁻¹ [79] και το OD-PABA στα 2.3 ng L⁻¹ [79]. Στο θαλασσινό νερό το E4360 από 1.8 ng L⁻¹ [80] και στα νερά πisinας το E4360 από 2.4-400 ng L⁻¹ [41, 80, 81], το E6300 από 6.9-330 ng L⁻¹ [41, 80] και το OD-PABA από 2.1-17 ng L⁻¹ [41, 80]. Οι αναλυτικές μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί αναφέρονται στον Πίνακα 1.7.

Φθαλικοί εστέρες

Οι φθαλικοί εστέρες, BBP και DnOP έχουν ανιχνευτεί στα επιφανειακά και υπόγεια ύδατα. Στο πόσιμο νερό και ιδιαίτερα στο εμφιαλωμένο έχουν προσδιοριστεί οι υψηλότερες συγκεντρώσεις. Η παρουσία τους στο εμφιαλωμένο νερό πιθανόν να οφείλεται: 1) σε ρυπογόνες ενώσεις οι οποίες είναι παρούσες στον υδάτινο φορέα, 2) στην μέθοδο εμφιάλωσης και στην εξωτερική ρύπανση, 3) στην μεταφορά των ενώσεων αυτών από τα δοχεία στα οποία αποθηκεύονται. Ο βουτυλοβενζυλοφθαλικός εστέρας (BBP) έχει ανιχνευτεί στο εμφιαλωμένο και στο νερό βρύσης σε συγκεντρώσεις της τάξης των $0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ [33, 82] και 0.012 έως $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ [33, 83], αντίστοιχα. Η υψηλότερη συγκέντρωση που έχει καταγραφεί είναι $38 \mu\text{g L}^{-1}$ στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής [84]. Αντίθετα, οι ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις του DnOP στο πόσιμο νερό είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης, τόσο στην Ευρώπη όσο και στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής. Στα επιφανειακά νερά, οι συγκεντρώσεις για το BBP κυμαίνονται από $0.06 \mu\text{g L}^{-1}$ για την Ευρώπη [84] έως $1.51 \mu\text{g L}^{-1}$ για τον Καναδά [84], π.χ. στο νερό ποταμών η ανιχνεύσιμη συγκέντρωση για το BBP βρέθηκε στα 11 ng L^{-1} [85]. Αντίστοιχα, για το DnOP οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται από $0.91 - 1.31 \mu\text{g L}^{-1}$ [84]. Τέλος, στα υπόγεια ύδατα υπάρχουν λίγες αναφορές σχετικά τους φθαλικοί εστέρες που μας ενδιαφέρουν. Η μέγιστη συγκέντρωση ($38 \mu\text{g L}^{-1}$) [84] που έχει ανιχνευτεί για το BBP είναι στις Ηνωμένες Πολιτείες. Οι αναλυτικές μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί αναφέρονται στον Πίνακα 1.8.

1.4.3. Έδαφος Και Ιζήματα

Ως έδαφος χαρακτηρίζεται το περίπλοκο εκείνο σύστημα, η σύσταση του οποίου αποτελείται από οργανική και ανόργανη ύλη, νερό και μικροοργανισμούς [86]. Η φυσική διάβρωση του εδάφους οδηγεί στην δημιουργία των ιζημάτων [86]. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, η κύρια αιτία συσσώρευσης των προς ανάλυση ουσιών στο έδαφος και στα ιζήματα είναι ο μη πολικός χαρακτήρας ($\log K_{ow} > 3.5$) και η χαμηλή διαλυτότητα τους.

Στο έδαφος η επιμόλυνση πραγματοποιείται με τρεις τρόπος: 1) από τον αέρα, μέσω της βροχής (σχήμα 1), 2) από τις ιλύς των Μ.Ε.Λ. (σχήμα 1) και 3) από την ανάμειξη των ιλύων με το γεωργικό έδαφος αποσκοπώντας στην βελτίωση του. Στην τελευταία περίπτωση, οι οργανικές ουσίες που υπάρχουν στις ιλύς μεταφέρονται στο γεωργικό έδαφος παραμένοντας σε αυτό από μερικούς μήνες έως και χρόνια [53]. Η σταθερότητα τους οφείλεται στον χαμηλό ρυθμό βιοδιάσπασης τους και στην απορρόφηση τους από την οργανική και ανόργανη ύλη [53].

Πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις

Οι πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις έχουν ανιχνευτεί σε ιζήματα επιφανειακών υδάτων (ποτάμια, λίμνες), στο έδαφος αλλά και σε εδάφη που έχουν αναμιχθεί με ποσότητες ιλύων. Στην περίπτωση των ιζημάτων ο Xiangying Zeng και η ομάδα του [87] ανίχνευσαν τις ακόλουθες πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από: $< 0.3 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dry wt}$ για την DPML, $0.3-8.31 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dry wt}$ για την ADBI, $< 0.3 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dry wt}$ για την AHMI, $< 0.67 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dry wt}$ για την ATII, HHCB $2.62-121 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dry wt}$ για την HHCB, $3.14-42.5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dry wt}$ για την AHTN. Οι ερευνητικές ομάδες Steffen [88] και Dsikowitzky L. [74] ανέλυσαν ιζήματα από ποτάμια της Γερμανίας και ανίχνευσαν τις πολυκυκλικές ενώσεις, AHTN, HHCB και DPML σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0.054 έως $1399 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dry wt}$, 0.0039 έως $191 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dry wt}$ και $0.0007 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dry wt}$, αντίστοιχα. Οι Steffen D. [88], Landesanstalt [89], Wiegel S. [90] και Fromme H. [91] ανίχνευσαν τις ακόλουθες πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις σε ιζήματα σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από $0.5-5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dry wt}$ για την DPML, από $0.5-68 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dry wt}$ για την ADBI, από $0.5-93 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dry wt}$ για την AHMI και από $0.5-220 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dry wt}$ για την ATII. Σε εδάφη, τα οποία είχαν υποστεί επεξεργασία, η ερευνητική ομάδα της Difrancesco A. M. [92] προσδιόρισε πάνω από τα όρια ποσοτικοποίησης τις πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις, AHTN, HHCB και DPML. Οι αναλυτικές μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί αναφέρονται στον Πίνακα 1.6.

Αντιηλιακοί Παράγοντες

Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί για την ύπαρξη των αντιηλιακών παραγόντων σε στερεά υποστρώματα είναι πολύ πιο λίγες συγκρινόμενες με αυτές των υδάτων. Παρόλα αυτά έχουν ανιχνευτεί σε ιζήματα και στο έδαφος. Στα ιζήματα οι ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις κυμαίνονται από 0.06–9730 ng kg⁻¹ dry wt για το E4360 [94, 95] και από 2.3–320 ng g⁻¹ dry wt για το E6300 [95]. Η ερευνητική ομάδα της Rodil R. [93] ήλεγξε την ύπαρξη των περισσότερο διαδεδομένων αντιηλιακών παραγόντων (OS, ODPABA, EHMS, E4360, E6300) σε τρεις διαφορετικούς τύπους ιζημάτων με τις συγκεντρώσεις τους να είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης. Τέλος, ο Jeon H. K. [94] ανίχνευσε το E4360 στο έδαφος σε συγκέντρωση από 730–16550 ng kg⁻¹. Οι αναλυτικές μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί αναφέρονται στον Πίνακα 1.7.

Φθαλικοί εστέρες

Οι φθαλικοί εστέρες έχουν ανιχνευτεί στο έδαφος και στα ιζήματα. Μπορούν να εισέλθουν στο έδαφος με την άρδευση και την τοποθέτηση πλαστικών μεμβρανών [96]. Οι ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις κυμαίνονται από 0.13–0.8 μg kg⁻¹ για το BBP [97, 98] και από 11.5–13.7 μg kg⁻¹ για το DnOP [98]. Στα εδάφη, τα οποία έχουν υποστεί βελτίωση με την προσθήκη ιλύος, οι συγκεντρώσεις βρέθηκαν να κυμαίνονται από 2.4 έως 3.9 μg kg⁻¹ για το BBP [98] και 5.6 έως 6.8 μg kg⁻¹ για το DnOP [98]. Στα ιζήματα οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται από 0.034 έως 0.2 μg g⁻¹ dry wt για το BBP [99, 100] και 0.02 έως 0.078 μg g⁻¹ dry wt για το DnOP [100]. Οι αναλυτικές μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί αναφέρονται στον Πίνακα 1.8.

1.4.4. Χλωρίδα Και Πανίδα

Ο λιπόφιλος χαρακτήρας των προς ανάλυση ουσιών, οδηγεί στη συσσώρευση τους στον λιπώδη ιστό των υδρόβιων οργανισμών, οδηγώντας στην βιοσυσσώρευση καθώς κινούμαστε στην τροφική αλυσίδα.

Πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις

Οι πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις έχουν ανιχνευτεί στην πανίδα και στην χλωρίδα από τη δεκαετία του '90. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στον λιπώδη ιστό των ψαριών, σε χέλια του γένους *Anguilla anguilla* και σε μύδια του γένους *Mytilus edulis*, *Dreissena polymorpha*, *Perna viridis* ανίχνευσαν τις πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις HHCB, AHTN και HHCB. Στα ψάρια, η μέγιστη συγκέντρωση για το HHCB βρέθηκε στα 159 mg Kg⁻¹ λίπους [101] , για το AHTN από 58 mg kg⁻¹ λίπους [101] και για το ADBI 1.12 mg kg⁻¹ λίπους [101]. Στα μύδια του γένους *Mytilus edulis*, οι ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις για το HHCB κυμαίνονταν από 0.018 έως 1.65 mg kg⁻¹ [102, 103] και για το AHTN από 0.019 έως 0.06 mg kg⁻¹ [103, 104]. Στα μύδια του γένους *Dreissena polymorpha* οι συγκεντρώσεις κυμαίνονταν από 0.223 έως 1.75 mg kg⁻¹ για το HHCB [103], από 0.163 έως 1.20 mg kg⁻¹ [103] για το AHTN και από 0.0120 έως 0.0602 για το ADBI [103]. Για το γένος *Perna viridis* από 1.15 mg kg⁻¹ για το HHCB, 0.19 mg kg⁻¹ για το AHTN και 0.024 mg kg⁻¹ για το ADBI [103], Στα χέλια του γένους *Anguilla anguilla* οι συγκεντρώσεις κυμαίνονταν από 0.03 έως 91 mg kg⁻¹ για το HHCB [101], για το AHTN από 0.04 έως 57.9 mg kg⁻¹ [101] και 0.03 mg kg⁻¹ για το ADBI [101].

Αντιηλιακοί Παράγοντες

Λίγες αναφορές υπάρχουν σχετικά με την ύπαρξη των αντιηλιακών παραγόντων σε θαλάσσιους οργανισμούς. Οι συγκεντρώσεις των αντιηλιακών παραγόντων στον λιπώδη ιστό των ψαριών κυμαίνονταν από 21 έως 3100 ng g⁻¹ [75, 105]. Πιο συγκεκριμένα στο ψάρι Πέρκα η συγκέντρωση του E4360 ανιχνεύτηκε στα 300 ng g⁻¹ και του E6300 στα 880 ng g⁻¹ [42]. Στην Γερμανία και στην Ελβετία, η συγκέντρωση του E6300 βρέθηκε να είναι > 2 mg kg⁻¹ [75, 105].

1.4.5. Προϊόντα Προσωπικής Περιποίησης Και Η Επίδραση Τους Στον Άνθρωπο

Πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις

Πειραματικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην Γερμανία, την Ελβετία και την Αγγλία, αναφέρουν την ανίχνευση των πολυκυκλικών αρωματικών ενώσεων ΑΗΤΝ και ΗΗCB στον λιπώδη ιστό στο μητρικό γάλα και στο ανθρώπινο αίμα [106, 107, 108, 109]. Ο Z. Kuklenyik και η ομάδα του [109] ανίχνευσαν τις πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις, ΗΗCB, ΑΗΤΝ και ΑDBI, στο αίμα ανηλίκων και στο μητρικό γάλα. Στο αίμα οι συγκεντρώσεις κυμαίνονταν από 0.42 έως 1.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ για το ΗΗCB, από 0.38 έως 2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ για το ΑΗΤΝ και από 0.41 έως 3.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ για το ΑDBI. Αντίστοιχα στο μητρικό γάλα από 0.53 έως 2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ για το ΗΗCB, 0.38 έως 2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ για το ΑΗΤΝ και 0.62 έως 2.36 $\mu\text{g L}^{-1}$ για το ΑDBI [109]. Ο H.P. Hutter και η ομάδα του [110] ανίχνευσαν στο αίμα 114 ενήλικων εθελοντών αιμοδοτών, τις πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις: ΗΗCB, ΑΗΤΝ, ΑDBI, DPMI και ATII σε συγκεντρώσεις 4100 ng L^{-1} , 800 ng L^{-1} , 17 ng L^{-1} , 25.5 ng L^{-1} και 39 ng L^{-1} , αντίστοιχα.

Αντιηλιακοί Παράγοντες

Οι επιστήμονες για πολλά χρόνια είχαν την υποψία ότι τα χημικά αντιηλιακά φίλτρα UV, δρουν ως ενδοκρινικοί διαταράκτες, μιμούμενα τις γυναικείες ορμόνες (οιστρογόνα). Αρκετοί θεωρούν τις ουσίες αυτές υπεύθυνες για τα ορμονικά προβλήματα των γυναικών, τον καρκίνο του μαστού αλλά και την θηλυκοποίηση των ψαριών καθώς τα αντιηλιακά ξεπλένονται στις θάλασσες.

Έχει διαπιστωθεί ότι ο αντιηλιακός παράγοντας E4360 (βενζοφαινόνη-3) συσσωρεύεται στο ανθρώπινο σώμα μέσω απορρόφησης του από το δέρμα, ενώ μια μικρή ποσότητα διέρχεται από τα νεφρά όπου μεταβολίζεται και αποβάλλεται από τα ούρα. Η βενζοφαινόνη-3 μεταβολίζεται σε τουλάχιστον τρεις μεταβολίτες, την 2,4-dihydroxybenzophenone (DHB), την 2,20-dihydroxy-4-methoxybenzophenone (DHMB) και την 2,3,4-trihydroxybenzophenone (THB). Η Schlumph και η ομάδα της [111] εξέτασαν τους ευρέως χρησιμοποιούμενους αντιηλιακούς παράγοντες: E4360,

EHMS, E6300 και OD-PABA. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι οι προαναφερθέντες αντιηλιακοί παράγοντες, δρουν ως ορμονικοί διαταράκτες, μιμούμενοι τις γυναικείες ορμόνες (οιστρογόνα), προκαλώντας αύξηση των καρκινικών κυττάρων. Τα αποτελέσματα της έρευνας της Schlump επιβεβαιώνονται και από άλλες ερευνητικές εργασίες [112, 113]. Επιπλέον, οι αντιηλιακοί παράγοντες, E4360 και octyl- methoxycinnamate (OMC) ανιχνεύτηκαν στο μητρικό γάλα πάνω από 445 ng g^{-1} λίπους [114] καθώς και σε δείγματα ούρων [115].

Φθαλικοί εστέρες

Ο άνθρωπος και ιδιαίτερα τα παιδιά, εκτίθενται στους φθαλικούς εστέρες μέσω εισπνοής (αέρας και σκόνη), απορρόφησης από το δέρμα και μέσω της τροφικής αλυσίδας. Έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 1990 στον Καναδά έδειξε ότι η ημερήσια έκθεση στον φθαλικό εστέρα DEHP ήταν: 9 μg kg^{-1} βάρος σώματος /ανά μέρα στα βρέφη, 19 μg kg^{-1} βάρος σώματος /ανά μέρα στα βρέφη που αρχίζουν να περπατούν, 14 μg kg^{-1} βάρος σώματος/ανά μέρα στα παιδιά και 6 μg kg^{-1} βάρος σώματος/ανά μέρα στους ενήλικες [34]. Η αυξημένη συγκέντρωση των φθαλικών εστέρων και των μεταβολιτών τους στα βρέφη, σε σχέση με τα παιδιά μεγαλύτερης ηλικίας και τους ενήλικες, οφείλεται κυρίως στο καθημερινό μασούλημα πλαστικών παιχνιδιών αλλά και στα προϊόντα παιδικής φροντίδας όπως οι λοτιόν, οι πούδρες και τα σαμπουάν.

Η Swan και η ομάδα της [116] διαπίστωσαν ότι η έκθεση σε φθαλικούς εστέρες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, προκαλεί μείωση της απόστασης των γενετικών οργάνων των αρσενικών βρεφών. Η αυξημένη συσσώρευση των φθαλικών εστέρων στο ανθρώπινο ενήλικο σώμα, επηρεάζει τα επίπεδα των ορμονών [117]. Πολλές *in vitro* μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έδειξαν ότι οι φθαλικοί εστέρες: BBP και DBP, συνδέονται με το υποδοχέα α του οιστρογόνου (ERα) επηρεάζοντας τη φυσιολογική λειτουργία του, πολλαπλασιάζοντας τα καρκινικά MCF-7 κύτταρα που ευθύνονται για τον καρκίνο του μαστού [118, 119, 120, 121].

Πίνακας 1.6: Αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των PCMs στο περιβάλλον.

PCMs				
Δείγμα	Ουσίες	Εκχύλιση	Οργανολογία	Βιβλιογραφία
• Μ.Ε.Λ.	Όλες οι PCMs	LLE	GC/EI-MS	[54]
• Μ.Ε.Λ.	HHCB, AHTN	LLE	GC/EI-MS	[122]
• Μ.Ε.Λ.	Όλες οι PCMs	LLE	GC/EI-MS	[123]
(είσοδος / έξοδος)			GC/NCI-MS	
• Μ.Ε.Λ. (έξοδος)	Όλες οι PCMs	LLE	GC/EI-MS	[124]
• Μ.Ε.Λ.	HHCB, AHTN	CLLE	GC/EI-MS	[125, 126]
• Μ.Ε.Λ. (έξοδος)	HHCB, AHTN, ATII, ADBI, AHMI, DPMI	SLLE	GC/EI-MS	[74]
• Μ.Ε.Λ.	HHCB, AHTN	SPE	GC/EI-MS	[92]
(είσοδος / έξοδος)				
• Μ.Ε.Λ. (έξοδος)	Όλες οι PCMs	SPE	GC/EI-MS	[127, 128]
• Μ.Ε.Λ.	HHCB, AHTN	SPE	GC/EI-MS	[70]
• Μ.Ε.Λ. (έξοδος)	Όλες οι PCMs	HS-SPME	GC/EI-MS	[129]
• Μ.Ε.Λ. (έξοδος)	Όλες οι PCMs	DS-SPME	GC/EI-MS	[129]
• Μ.Ε.Λ. (έξοδος)	HHCB, AHTN, ATII, ADBI, AHMI	SDE	GC/EI-MS	[91]
Επιφανειακά νερά	ADBI, AHMI			
• Μ.Ε.Λ.	HHCB, AHTN, ATII, ADBI, AHMI	ASE	GC/MS	[54]
(ενεργή ιλύς)				
• Μ.Ε.Λ.	HHCB, AHTN	Soxhlet-	GC-MSD	[130]
(ενεργή ιλύς)		extracted		
• Μ.Ε.Λ. (ενεργή ιλύς)	Όλες οι PCMs	LLE	GC/MS	[131]

Δείγμα	Ουσίες	Εκχύλιση	Οργανολογία	Βιβλιογραφία
• Μ.Ε.Λ. (ενεργή ιλύς)	HHCB, AHTN	PFE	GC/EI-MS	[132]
• Μ.Ε.Λ. (ενεργή ιλύς / επεξεργασμένη ιλύς)	HHCB, AHTN, ATII, ADBI, AHMI	Soxhlet- extracted	GC/EI-MS	[53]
• Μ.Ε.Λ. (ενεργή ιλύς)	HHCB, AHTN	Ultrasonic extraction	GC/EI-MS	[133]
• Θαλασσινό νερό	HHCB, AHTN	LLE	GC/EI-HRMS	[134]
• Εμφιαλωμένα νερά και βρύσης	HHCB, AHTN, ADBI, AHMI, DPMI, ATII	USAEME	GC/MS	[135]
• Μ.Ε.Λ.	HHCB, AHTN, ADBI, AHMI, DPMI, ATII	USAEME	GC/MS	[135]
• Επιφανειακά νερά / Μ.Ε.Λ.	HHCB, AHTN,	LLE	GC/EI-MS	[136, 137]
• Επιφανειακά νερά	HHCB, AHTN, ADBI,	LLE	GC-ECD	[138]
• Επιφανειακά νερά	HHCB, AHTN, ADBI	DS-SPME	GC/EI-MS	[73]
• Υπόγεια νερά	HHCB, AHTN	SPE (C18)	GC/EI-MS	[134]
• Επιφανειακά νερά	HHCB, AHTN	SPE	GC/MS	[70]
• Ιζήματα	HHCB, AHTN	SPE	GC/MS	[139]
• Ιζήματα	HHCB, AHTN, ADBI, ATII, AHMI, DPMI	Soxhlet	GC/MS	[87]
• Ιζήματα	HHCB, AHTN	PLE / SPE	GC/MS	[139]
• Έδαφος	HHCB, AHTN	ASE	GC/MS	[92]
• Ψάρια	HHCB, AHTN, ADBI	SPD / PLE	GC/MS	[140]

Δείγμα	Ουσίες	Εκχύλιση	Οργανολογία	Βιβλιογραφία
✿ Ψάρια	HHCB, AHTN, ATII, ADBI, AHMI	PFE	GC/EI-MS	[141]
✿ Ψάρια	HHCB, AHTN, HHCB-lactone,	-	GC/EI-MS	[142]
✿ Ψάρια	Όλες οι PCMs	-	GC/EI-MS GC/ECD	[143]
✿ Ψάρια	Όλες οι PCMs	Αφυδάτωση θειικό νάτριο και NaOH	GC/EI-MS	[127, 140]
✿ Χέλια	HHCB, AHTN, ATII, ADBI, AHMI	Soxhlet	GC/EI-MS	[144]
✿ Οστρακόδερμα	HHCB, AHTN, ADBI	Soxhlet	GC/MSD	[145]

Πίνακας 1.7 Αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των αντιηλιακών παραγόντων στο περιβάλλον.

Δείγμα	Ουσίες	Εκχύλιση	Οργανολογία	Βιβλιογραφία
☼ Μ.Ε.Λ.	E6300	LLE	GC-EI-SIM-MS	[131]
☼ Μ.Ε.Λ.	E6300, E4360, ODPABA, HMS.	MALLE	LC-MS/MS	[79]
☼ Μ.Ε.Λ.	E6300, E4360	SPE	GC/EI-MS	[75]
☼ Μ.Ε.Λ.	E6300, E4360, ODPABA, HMS, E2292	SPE	GC-MSD	[41]
☼ Μ.Ε.Λ.	E6300, E4360, ODPABA,	SPE	LC-MS/MS	[79]
☼ Μ.Ε.Λ.	E6300	LLE	GC-EI-SIM-MS	[131]
☼ Έδαφος, ΐζημα, Νερό ποταμών	E4360	LLE	GC-MSD	[94]
☼ Ιζήματα	EHMS, ODPABA, E4360, E6300, OS	PLE	GC/MS	[93]

Πίνακας 1.8 Αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των φθαλικών εστέρων στο περιβάλλον.

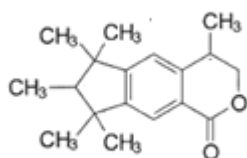
Δείγμα	Ουσίες	Εκχύλιση	Οργανολογία	Βιβλιογραφία
Μ.Ε.Λ. (είσοδος, έξοδος, ενεργή ιλύς)	BBP	SPE	GC	[43]
Μ.Ε.Λ. (είσοδος, έξοδος, ενεργή ιλύς)	BBP, DnOP		GC	[38]
Μ.Ε.Λ. (νερό, λάσπη, ενεργή ιλύς)	BBP	SBSE	GC/MS	[146]
Μ.Ε.Λ. (ενεργή ιλύς)	BBP, DnOP	USEPA 3540C	GC/MS	[147]
Επιφανειακά νερά /Εμφιαλωμένα και βρύσης νερά / Μ.Ε.Λ.	BBP, DnOP	USAEME	GC/MS	[135]
Πόσιμο νερό	BBP	SBSE-LD	LVI-GC-MS	[33]
Νερό	BBP, DnOP	SPME	GC/MS	[82]
Νερό	BBP, DnOP	mSPE	GC/MS	[148]
Απεσταγμένο νερό	BBP, DnOP	SDME	GC/MS	[149]
Εμφιαλωμένα νερά	BBP, DnOP	SPME	GC/MS	[150]
Εμφιαλωμένα νερά	BBP	SPE	GC/MS	[83]
Επιφανειακά νερά	BBP, DnOP	SPME	GC/MS	[85]
Έδαφος	BBP, DnOP	MADD	GC/MS	[98]
Έδαφος	BBP	PLE	GC/MS	[97]
Ιζήματα	BBP	USEPA, 1995	GC/MS	[99]
Νερό/ Ιζήματα	BBP, DnOP	US EPA, 2007	GC/MS	[151]

1.5. Προϊόντα Μετασχηματισμού Των Πολυκυκλικών Αρωματικών Ενώσεων, HHCB Και AHTN

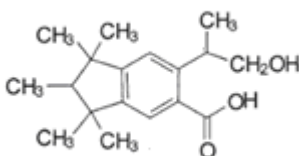
Το 1997 διαπιστώθηκε για πρώτη φορά η παρουσία των περισσότερων πολικών προϊόντων μετασχηματισμού των πολυκυκλικών αρωματικών ενώσεων, HHCB και AHTN.

HHCB

Το 1999 ο Franke [153] ερμήνευσε τη δομή και τη σύνθεση του κύριου προϊόντος μετασχηματισμού του HHCB, το 1,3,4,6,7,8-εξαυδρο-4,6,6,7,8,8-εξαμεθυλό κυκλοπεντάνιο -2- βενζοπυραν-1-όνη, HHCB-λακτόνη ή αλλιώς *galaxolidone* (Εικόνα 3α).



HHCB-λακτόνη (α)

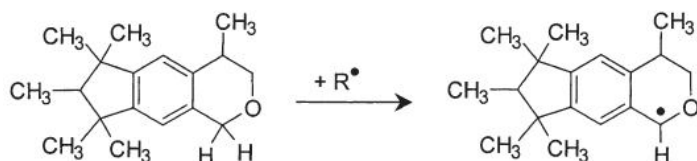


Οξύ της HHCB-λακτόνης (β)

Εικόνα 3. Η HHCB-λακτόνη (α) και το αντίστοιχο οξύ (β)

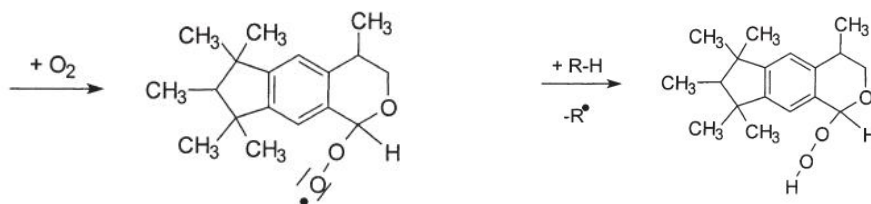
Αρκετοί ερευνητές, μεταξύ των οποίων και ο Franke [152] έχουν αποδώσει τον πιθανό μηχανισμό μετασχηματισμού του HHCB στην HHCB-λακτόνη. Μια πιθανή πορεία παρουσιάζεται στο σχήμα 4. Περαιτέρω υδρόλυση της HHCB-λακτόνης οδηγεί στο σχηματισμό του αντίστοιχου οξέος (σχήμα 4β) [153]. Οι Itrich [154] και Federle [155] απέδειξαν το σχηματισμό της HHCB-λακτόνης στην ενεργή ιλύ και στα νερά λίμνης, με χρόνο ζωής τις 35 και 21 ώρες, αντίστοιχα.

1. Ενεργοποίηση του ΗΗCB (σχηματισμός ρίζας)

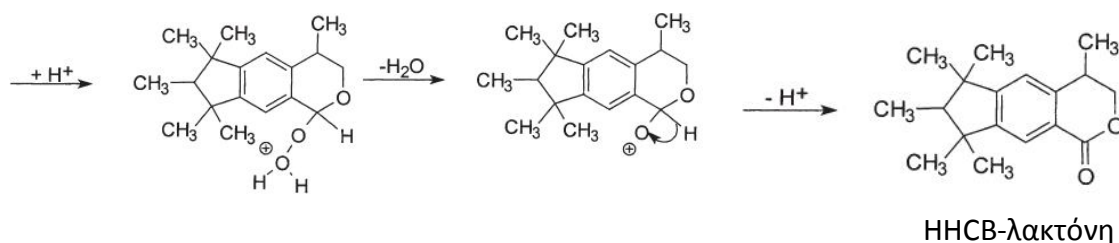


2. Προσθήκη οξυγόνου

3. Σχηματισμός υπεροξειδίου



3. Προσθήκη πρωτονίου και απομάκρυνση ενός μορίου νερού



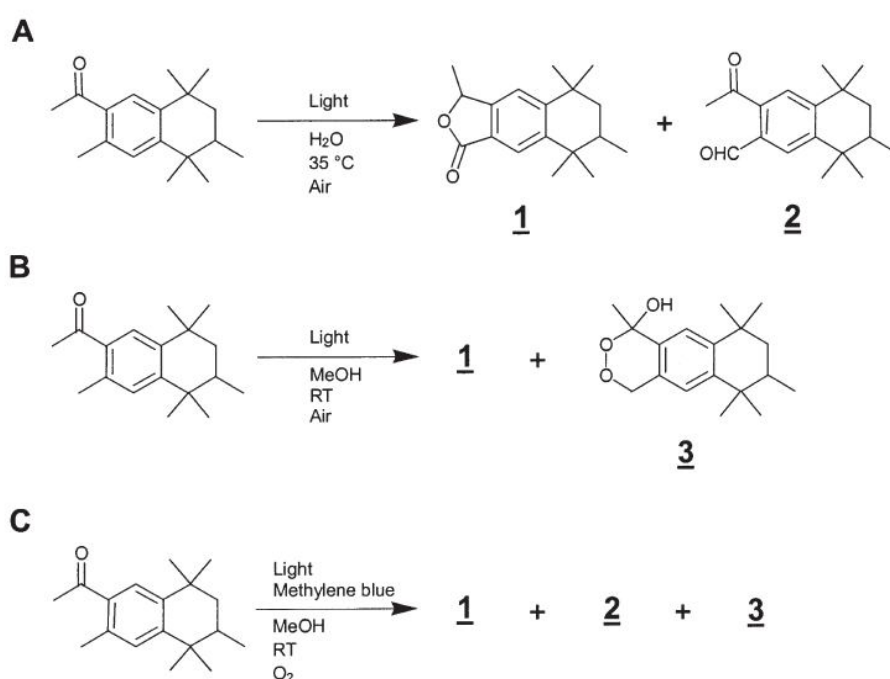
Σχήμα 4. Σχηματισμός της ΗΗCB-λακτόνης στο υδάτινο περιβάλλον.

Η ΗΗCB-λακτόνη έχει ανιχνευτεί σε επιφανειακά νερά [156, 157], σε ιζήματα [156], σε ψάρια [142] και στις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων (είσοδο, έξοδο, ενεργή ιλύ) [55, 72, 136, 137, 152, 153, 158].

ΑΗΤΝ

Για να προσδιοριστεί ο τρόπος μετασχηματισμού της πολυκυκλικής αρωματικής ένωσης ΑΗΤΝ στην αντίστοιχη λακτόνη, ελέγχθηκαν οι συνθήκες κάτω από τις οποίες φωτο-διασπάται. Αρχικά, υδατικό διάλυμα ΑΗΤΝ σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) δέχθηκε ακτινοβολία αλλά δεν παρατηρήθηκε διάσπαση αυτού. Περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας (στους 35°C) (σχήμα 5Α), οδήγησε στον σχηματισμό δυο προϊόντων, στο 3,5,5,6,8,8-hexamethyl-5,6,7,8-tetrahydro-3H-

naphtho[2,3-c]furan-1-one (**1**) και στο 3-acetyl-5,5,7,8,8-pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalene-2-carbaldehyde (**2**). Στην συνέχεια (σχήμα 5B) το αλκοολικό διάλυμα του ΑΗΤΝ σε θερμοκρασία δωματίου διασπάτε στην λακτόνη (**1**) και στο υπεροξείδιο (**3**). Τέλος, (σχήμα 5C) η προσθήκη χουμικών οξέων (σε υδατικό διάλυμα) και μπλε του μεθυλίου (σε αλκοολικό διάλυμα) δίνει μίγμα των (**1**), (**2**) και (**3**) ουσιών. Στο σχήμα 5 αποδίδονται σχηματικά όλες οι παραπάνω αντιδράσεις.



Σχήμα 5: Φωτοχημικές αντιδράσεις μετασχηματισμού του ΑΗΤΝ στην ΑΗΤΝ-λακτόνη, (α) υδατικό διάλυμα, (β) αλκοολικό διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου, (γ) αλκοολικό διάλυμα παρουσία O₂ και μπλε του μεθυλίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΓΡΗ ΥΓΡΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ

2.1 Εισαγωγή

Η προετοιμασία ενός δείγματος αποτελεί το 80% του συνολικού χρόνου ανάλυσης. Οι κύριες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η υγρή-υγρή εκχύλιση (LLE) και η εκχύλιση της στερεάς φάσης (SPE) [159]. Η υγρή υγρή εκχύλιση βασίζεται στην μεταφορά των προς ανάλυση ουσιών από το υδατικό διάλυμα στον κατάλληλο οργανικό διαλύτη (που είναι αναμίξιμος με το νερό). Ωστόσο, ορισμένες αδυναμίες της μεθόδου όπως ο σχηματισμός γαλακτώματος, η χρήση μεγάλων όγκων τοξικών οργανικών διαλυτών καθιστούν την μέθοδο αρκετά χρονοβόρα και μη φιλική προς το περιβάλλον [160].

Γι'αυτούς τους λόγους, τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητικών ομάδων έχει επικεντρωθεί στην ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθοδολογιών με κύριους στόχους την ελαχιστοποίηση του χρόνου εκχύλισης, την ευαισθησία της μεθόδου, την ορθότητα και την ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Η πρόθεση τους έγκειται στην "σμίκρυνση" της υγρής υγρής εκχύλισης με την δραστική μείωση του όγκου του διαλύτη εκχύλισης [161], οδηγώντας στην ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθοδολογιών όπως στην μικροεκχύλιση της σταγόνας (single-drop microextraction, SDME), στην υγρή φάση μικροεκχύλιση της ίνας (hollow fibre liquid-phase microextraction, HF-LPME), στην **υγρή υγρή μικροεκχύλιση διασποράς (*dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME*)** και στην **υγρή υγρή μικροεκχύλιση διασποράς βασισμένη στην στερεοποίηση της επιπλέουσας οργανικής σταγόνας (*dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method, DLLME-SFO*)**. Στην παρούσα διατριβή το ενδιαφέρον μας επικεντρώθηκε στις δυο νέες αναλυτικές μεθόδους, **DLLME** και **DLLME-SFO**, οι οποίες για πρώτη φορά αναπτύχθηκαν στο εργαστήριό μας.

2.2. Μικροεκχύλιση Της Σταγόνας (SDME)

Η μέθοδος της Μικροεκχύλισης Της Σταγόνας (Single-Drop Microextraction, SDME) είναι μια νέα μέθοδος προσυγκέντρωσης που ανακαλύφθηκε το 1996. Είναι απλή, γρήγορη και χαμηλού κόστους. Η αρχή μεθόδου βασίζεται στον διαλύτη εκχύλισης (αναμίξιμος με το νερό), ο όγκος του οποίου περιορίζεται στα 1-10 μL στο άκρο μιας σύριγγας [161]. Μετά το τέλος της εκχύλισης ο διαλύτης αποσύρεται εντός της σύριγγας και μεταφέρεται στο προς ανάλυση όργανο [162]. Η μέθοδος όμως δεν είναι ποσοτική και μόνο ένα μικρό μέρος των προς ανάλυση ουσιών εκχυλίζεται/προ-συγκεντρώνεται [160]. Η SDME μέθοδος διαχωρίζεται περαιτέρω στις παρακάτω κατηγορίες:

1. Άμεση μικροεκχύλιση της σταγόνας (DI-SDME)
2. Υπερκείμενης φάσης μικροεκχύλιση της σταγόνας (HS-SDME)
3. Υγρή υγρή υγρή μικροεκχύλιση (LLLME)
4. Συνεχούς ροής μικροεκχύλιση (CFME)

2.2.1. Άμεση Μικροεκχύλιση Της Σταγόνας (DI-SDME)

Στην DI-SDME μέθοδο, η σταγόνα που βρίσκεται στην άκρη της σύριγγας, τοποθετείται απευθείας εντός του υπό ανάδευση υδατικού διαλύματος για όσο διάστημα κρίνεται απαραίτητο. Στη συνέχεια αναρροφάται εντός της σύριγγας και μεταφέρεται στο προς ανάλυση όργανο (εικόνα 4α). Για να εφαρμοστεί η μέθοδος θα πρέπει να πληρούνται οι παρακάτω προϋποθέσεις: 1) ο διαλύτης εκχύλισης θα πρέπει να είναι αναμίξιμος με το υδατικό διάλυμα και 2) οι προς ανάλυση ουσίες θα πρέπει να έχουν αυξημένη διαλυτότητα στον διαλύτη εκχύλισης και όχι στο υδατικό διάλυμα [160, 163]. Η μέθοδος παρουσιάζει και μειονεκτήματα τα κυριότερα εκ των οποίων είναι [160, 163]:

- η μειωμένη σταθερότητα της σταγόνας σε υψηλές θερμοκρασίες και ταχύτητες ανάδευσης,

- διαλύτες με αυξημένη διαλυτότητα στο νερό και χαμηλά σημεία βρασμού δεν είναι κατάλληλοι για την DI-SDME εξαιτίας του αυξημένου ρυθμού διάλυσης και εξάτμισης τους.

2.2.2. Υπερκείμενης φάσης μικροεκχύλιση της σταγόνας (HS-SDME)

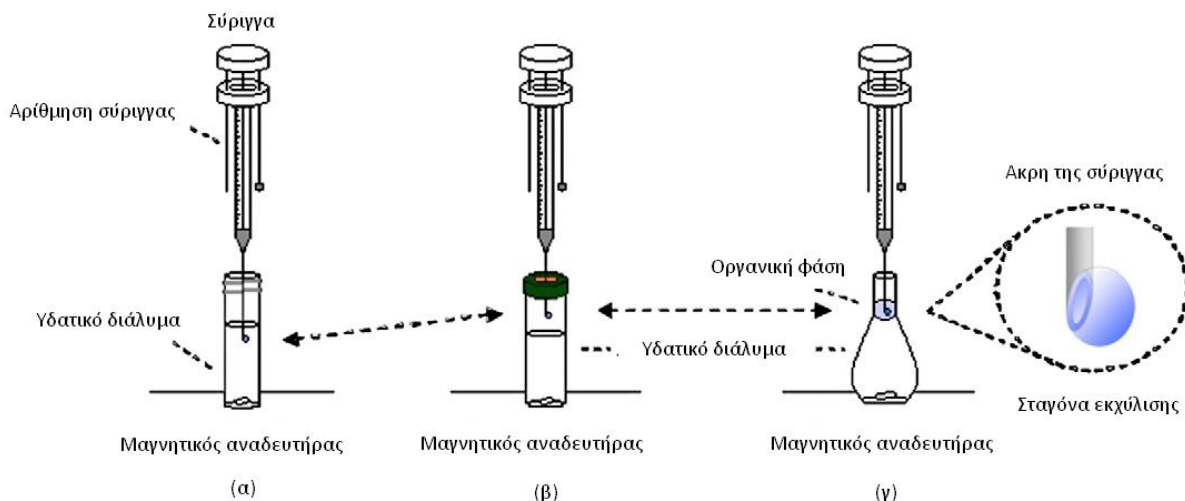
Η HS-SDME μέθοδος εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 2001 από τον Theis ([164] και βρίσκει εφαρμογή σε πτητικές και ημι-πτητικές ουσίες. Σύμφωνα με τη μέθοδο, η σταγόνα δεν εισέρχεται στο υδατικό διάλυμα αλλά εκτίθεται πάνω από την επιφάνεια του με τη βοήθεια της σύριγγας (εικόνα 4β). Η μεταφορά μάζας από το διάλυμα στην σταγόνα λαμβάνει χώρα ταχύτατα και αυξάνεται με την ανάδευση του διαλύματος, όπως έχει αναφερθεί και από την ερευνητική ομάδα των Fiamegos και Stalikas [165]. Έτσι η θερμοδυναμική ισορροπία ανάμεσα στο υδατικό διάλυμα και στην αέρια φάση επιτυγχάνεται άμεσα. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι:

- η εκχύλιση και η προσυγκέντρωση λαμβάνουν χώρα σε ένα στάδιο,
- η υψηλή καθαρότητα του εκχυλισμένου δείγματος. Αυτό οφείλεται στην μη εκχύλιση μη-πτητικών και μεγάλου μοριακού βάρους ουσιών,
- η μέθοδος εφαρμόζεται σε αμέταλλα και σε οργανομεταλλικές ενώσεις [164].

2.2.3. Υγρή Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση (LLLME)

Η LLLME μέθοδος εφαρμόστηκε πρώτη φορά το 1999 από τους Ma και Cantwell [166] και βρίσκει εφαρμογή σε ουσίες που μπορούν να ιονιστούν. Η αρχή μεθόδου στηρίζεται στην εκχύλιση των αναλυτών από το προς ανάλυση διάλυμα μέσω μιας οργανικής στρώσης ή μεμβράνης (η πυκνότητα της οποίας είναι χαμηλότερη από του νερού) με ταυτόχρονη επανεκχύλιση σε μια υδατική μικρό-σταγόνα (εικόνα 4γ). Το pH του υδατικού διαλύματος και της μικρό-σταγόνας ρυθμίζονται κατάλληλα ώστε οι ουσίες αρχικά να βρεθούν στην ουδέτερη μορφή τους, να εκχυλιστούν από τον οργανικό διαλύτη και στη συνέχεια να ιονιστούν [164].

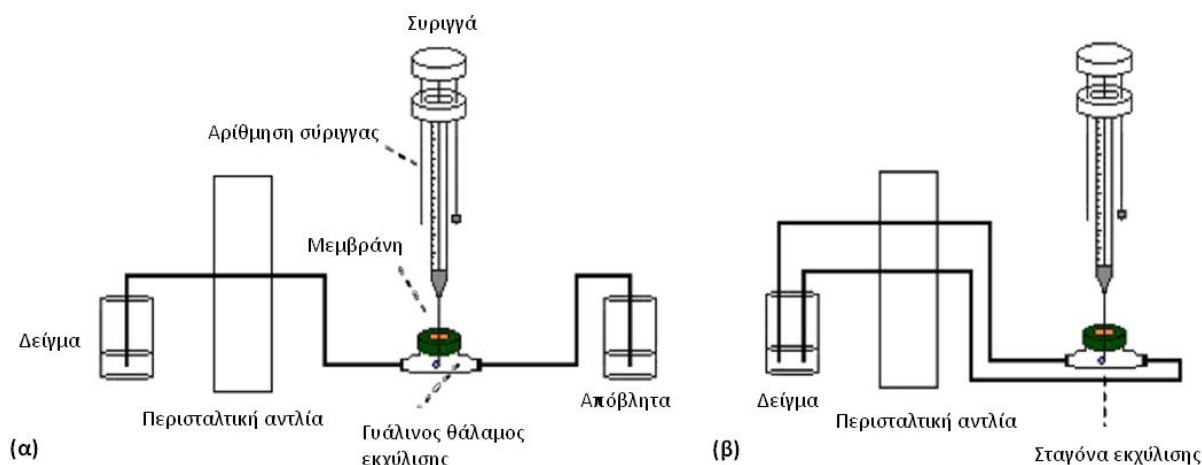
Η ιοντική μορφή των αναλυτών τελικά βρίσκεται μέσα στην μικρό-σταγόνα που οδηγείται για ανάλυση.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση των μεθόδων (α) DI-SDME, (β) HS-SDME και (γ) LLLME.

2.2.4. Συνεχούς Ροής Μικροεκχύλιση (CFME)

Η CFME μέθοδος εφαρμόστηκε πρώτη φορά το 2000 από τους Liu και Lee [167]. Οι βασικές διαφορές από τις προαναφερθείσες μεθόδους είναι η αντικατάσταση του γυάλινου φιαλιδίου με ένα κατάλληλο γυάλινο θάλαμο εκχύλισης και η μη ανάδευση του διαλύματος αλλά η δόνηση του με σταθερό ρυθμό (πάνω-κάτω). Στην εικόνα 5α παρουσιάζεται αναλυτικά η όλη διαδικασία. Όταν ο γυάλινος θάλαμος γεμίσει με το δείγμα, στην άκρη της σύριγγας σχηματίζεται μια σταγόνα η οποία αναρροφάται και εισάγεται στο κατάλληλο όργανο για ανάλυση. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η επαφή της σταγόνας με διάλυμα το οποίο ανανεώνεται διαρκώς [167, 168], οδηγώντας σε αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης σε σχέση με την στατική φάση εκχύλισης [159]. Ο Xia και η ομάδα του [168] εφάρμοσαν μια παραλλαγή της μεθόδου, την ονομαζόμενη κυκλικής ροής μικροεκχύλιση (cycle-flow microextraction). Η διαφορά από τη συνεχούς ροής είναι η επανεκχύλιση των αποβλήτων. Ο τρόπος λειτουργίας της παρουσιάζεται στην εικόνα 5β.



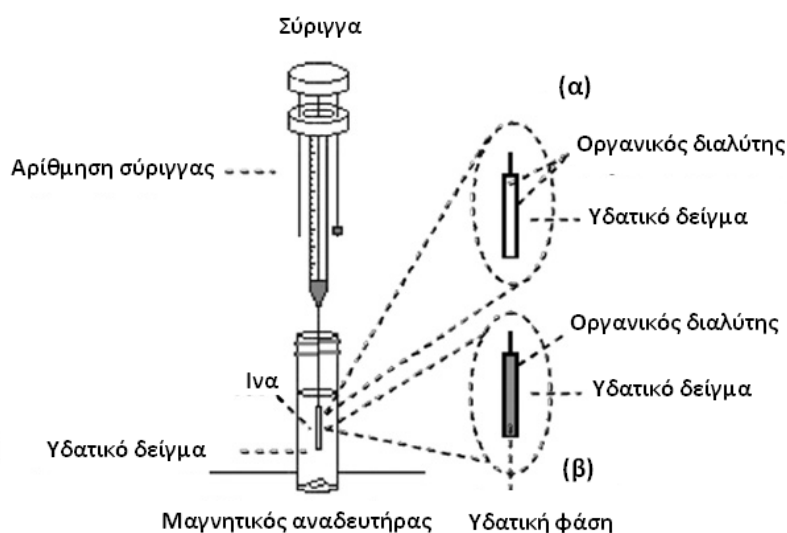
Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση των μεθόδων (α) CFME και (β) κυκλικής ροής μικροεκχύλιση.

2.3. Υγρής Φάσης Μικροεκχύλιση της Ίνας (HF-LPME)

Με την HF-LPME μέθοδο [169] επιτυγχάνεται η εκχύλιση και προσυγκέντρωση των προς ανάλυση ουσιών από σύνθετα δείγματα. Οι ουσίες εκχυλίζονται από το υδατικό διάλυμα σε ένα αναμίξιμο οργανικό διαλύτη και ακινητοποιούνται από το πορώδες υλικό της ίνας [170] η σύσταση της οποίας είναι πολυπροπυλένιο και συγκρατείται στην άκρη μιας σύριγγας όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 6α. Η οργανική σύσταση του αποδέκτη δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης του δείγματος σε όργανα υγρής και αέριας χρωματογραφίας (HPLC και GC). Εναλλακτική μέθοδος της HF-LPME είναι η HF-LLPME η οποία περιορίζεται σε ουσίες που ιοντίζονται. Αυτές εκχυλίζονται από το υδατικό διάλυμα διαμέσου ενός αναμίξιμου οργανικού διαλύτη, ακινητοποιούνται από το πορώδες υλικό της ίνας και εν συνεχεία καταλήγουν στην υδατική φάση που βρίσκεται εντός της ίνας όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 6β. Η υδατική φάση του αποδέκτη δίνει τη δυνατότητα ανάλυση του δείγματος από περισσότερο σύνθετα όργανα.

Στην HF-LPME μέθοδο η απόδοση της εκχύλισης συγκρινόμενη με αυτή της DI-SDME είναι υψηλότερη. Αυτό οφείλεται στην υδρόφοβη φύση της ίνας, επιτρέποντας αυξημένες ταχύτητες ανάδευσης επιταχύνοντας την κινητική της εκχύλισης. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα είναι η απόσταση ανάμεσα στο υδατικό

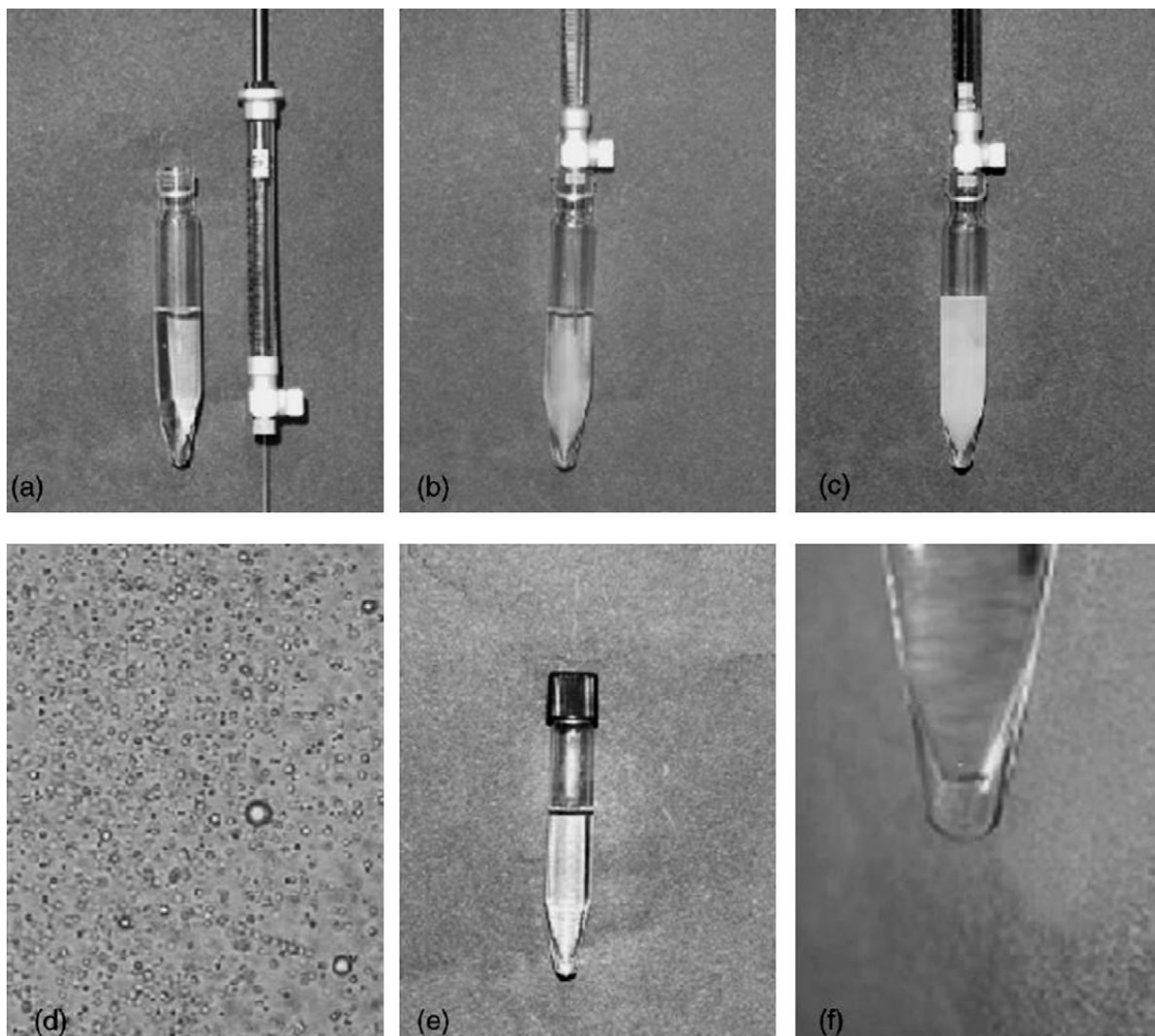
διάλυμα και τον αποδέκτη, ευνοώντας το ρυθμό μεταφοράς μάζας σε σχέση με την SDME μέθοδο. Τέλος, το μικρό μέγεθος των πόρων τις ίνας προάγουν ένα είδος φιλτραρίσματος οδηγώντας σε καθαρά εκχυλιζόμενα δείγματα [160]. Το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι στην ευαισθησία της ίνας καθώς η μη επιδέξια χρήση της ενδέχεται να οδηγήσει σε επιμόλυνση και καταστροφή της [160].



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση των μεθόδων (α) HF-LPME και (β) HF-LLPME.

2.4. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς (**DLLME**)

Το 2006 ο Rezaee και η ομάδα του [171] ανέπτυξαν μια νέα αναλυτική μεθοδολογία μικροεκχύλισης, την **υγρή-υγρή μικροεκχύλιση διασποράς (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)**, η οποία βασίζεται σε ένα τριαδικό σύστημα διαλυτών. Η αποτελεσματικότητα της στηρίζεται στην επιλογή των κατάλληλων διαλυτών εκχύλισης και διασποράς. Απαραίτητη προϋπόθεση στην επιλογή του διαλύτη εκχύλισης είναι να έχει πυκνότητα μεγαλύτερη από αυτή του νερού ενώ ο διαλύτης διασποράς να είναι αναμίξιμος με τον διαλύτη εκχύλισης και το υδατικό διάλυμα. Στη συνέχεια οι διαλύτες εκχύλισης και διασποράς αναμιγνύονται και εμβολιάζονται απευθείας εντός του υδατικού διαλύματος μέσω μιας σύριγγας (εικόνα 7a, b, c). Το μίγμα αναδεύεται σχηματίζοντας πλήθος μικρών σταγόνων (θολώμα) οι οποίες διασπείρονται σε όλη την επιφάνεια του υδατικού διαλύματος (εικόνα 7d). Μετά το σχηματισμό του θολώματος η επιφάνεια επαφής ανάμεσα στον διαλύτη εκχύλισης και το υδατικό διάλυμα αυξάνεται πολύ. Έτσι η ισορροπία του συστήματος επιτυγχάνεται ταχύτατα και ο χρόνος εκχύλισης είναι πολύ σύντομος. Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρείται, με τον διαλύτη εκχύλισης να καταβυθίζεται και να απομακρύνεται με τη βοήθεια μιας σύριγγας ενώ η κατάλληλη ποσότητα εγχέεται εντός του οργάνου (εικόνα 7e, f). Η διαδικασία της μεθόδου παρουσιάζεται αναλυτικά στην εικόνα 7. Τα πλεονεκτήματα της είναι το χαμηλό κόστος, η ταχύτητα εκτέλεσης, οι υψηλές ανακτήσεις, η χρήση μικρών όγκων οργανικών διαλυτών και η εφαρμογή της μεθόδου σε πλήθος αναλυτών [171, 172].



Εικόνα 7: Τα στάδια της **DLLME**: (a) πριν τον εμβολιασμό το μίγματος διαλυτών εκχύλισης και διασποράς, (b) έναρξη διαδικασίας εμβολιασμού, (c) τέλος εμβολιασμού, (d) σχηματισμός σταγόνων, (e) μετά τη φυγοκέντρηση και (f) η καταβυθιζόμενη φάση.

2.4.1. Παράγοντες Που Επηρεάζουν Την **DLLME** Μέθοδο

Η απόδοση της **DLLME** μεθόδου επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Οι κυριότεροι εκ των οποίων είναι: i) ο διαλύτης εκχύλισης, ii) ο διαλύτης διασποράς, iii) ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης, iv) ο όγκος του διαλύτη διασποράς, v) ο χρόνος της εκχύλισης και vi) η ιοντική ισχύς.

2.4.1.1. Επιλογή Διαλύτη Εκχύλισης

Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης είναι μεγίστης σημασίας για την **DLLME** μέθοδο, γι αυτό το λόγο θα πρέπει να πληρούνται οι παρακάτω προϋποθέσεις [173]:

- ☞ η πυκνότητα του θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτή του νερού, επιτρέποντας τον διαχωρισμό του από το υδατικό διάλυμα μετά την φυγοκέντρωση,
- ☞ να έχει μικρή διαλυτότητα στο νερό,
- ☞ να έχει τη δυνατότητα να εκχυλίζει τις προς ανάλυση ουσίες και
- ☞ να παρουσιάζει καλή χρωματογραφική συμπεριφορά.

Οι παραπάνω προϋποθέσεις πληρούνται ικανοποιητικά από αλογονομένους διαλύτες όπως είναι: ο τετραχλωράνθρακας (CCl_4), το διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2), το χλωροφόρμιο (CHCl_3), το τετραχλώροαιθάνιο ($\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$), το χλώροβενζόλιο ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$), το διχλωροαιθάνιο ($\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$) και ο διθειάνθρακας (CS_2) [173]. Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζονται αναλυτικά οι φυσικές ιδιότητες τους.

Πίνακας 2.1: Φυσικές ιδιότητες των διαλυτών εκχύλισης [174].

Διαλύτες	Σ.Β. ^α (°C)	Τ.Α. ^β (Torr)	Διαλυτότητα * (mg L ⁻¹)	Πυκνότητα (g cm ⁻³)	Ιξώδες (cP)	Ε.Τ. ^γ (dyn cm ⁻¹)	Δ.Ρ. ^δ (D)	Δ.Σ. ^ε
CH ₂ Cl ₂	39.6	435.8	1980	1.32	0.39 (30 °C)	26.54 (30 °C)	1.14	8.93
CCl ₄	76.6	115.2	770	1.58	0.90	26.13	0.00	2.23
CHCl ₃	61.2	194.8	8500	1.48	0.54	26.53	1.15	4.81 (20 °C)
C ₆ H ₅ Cl	131.7	11.7	327	1.10 (20 °C)	0.72 (30 °C)	31.98 (30 °C)	1.62	5.62
C ₂ H ₄ Cl ₂	83.5	83.3 (20 °C)	8100 (20 °C)	1.25	0.73 (30 °C)	30.84 (30 °C)	1.83	10.37
CS ₂	46.2	361.6	2100 (20 °C)	1.29	0.36 (20 °C)	32.25 (20 °C)	0.06	2.64

^α Σ.Β. = Σημείο Βρασμού

^β Τ.Α.=Τάση Ατμών

^γ Ε.Τ.= Επιφανειακή Τάση

^δ Δ.Ρ. = Διπολική Ροπή

^ε Δ.Σ. =Διηλεκτρική Σταθερά

* Η διαλυτότητα στο νερό

2.4.1.2. Επιλογή Διαλύτη Διασποράς

Στην περίπτωση του διαλύτη διασποράς θα πρέπει να πληρούνται ταυτόχρονα οι παρακάτω δυο προϋποθέσεις: 1) να αναμιγνύεται με το υδατικό διάλυμα (υδατική φάση) και 2) να αναμιγνύεται με τον διαλύτη εκχύλισης (οργανική

φάση). Ο ρόλος του είναι η διασπορά του διαλύτη εκχύλισης εντός του υδατικού διαλύματος αυξάνοντας την επιφάνεια επαφής του με το υδατικό δ/μα, διευκολύνοντας τη μεταφορά μάζας από την υδατική στην οργανική φάση επιταχύνοντας την εκχύλιση των ουσιών. Οι διαλύτες διασποράς έχουν χαμηλό κόστος και τοξικότητα ενώ οι κύριοι εκπρόσωποι είναι: η μεθανόλη, η ακετόνη, η αιθανόλη και το ακετονιτρίλιο [173]. Στον Πίνακα 2.2 παρουσιάζονται αναλυτικά οι φυσικές ιδιότητες τους.

Πίνακας 2.2: Φυσικές ιδιότητες των διαλυτών διασποράς [174].

Διαλύτες διασποράς	Σ.Β. ^α (°C)	Τ.Α. ^β (Torr)	Διαλυτότητα στο νερό (mg L ⁻¹)	Πυκνότητα (g cm ⁻³)	Ιξώδες (cP)	Ε.Τ. ^γ (dyn cm ⁻¹)	Δ.Ρ. ^δ (D)	Δ.Σ. ^ε
Μεθανόλη (MeOH)	64.5	127.0	∞	0.79	0.55	22.30	2.87	32.66
Αιθανόλη (EtOH)	78.3	59.0	∞	0.79	1.08	22.32 (20 °C)	1.66	24.55
Ακετόνη (Ac)	56.1	231.1	∞	0.78	0.30	22.68	2.69	20.56
Ακετονιτρίλιο (ACN)	81.6	88.81	∞	0.78	0.34	28.25	3.53	35.94

^α Σ.Β. = Σημείο Βρασμού

^β Τ.Α.=Τάση Ατμών

^γ Ε.Τ.= Επιφανειακή Τάση

^δ Δ.Ρ. = Διπολική Ροπή

^ε Δ.Σ. = Διηλεκτρική Σταθερά

2.4.1.3. Όγκος Διαλύτη Εκχύλισης

Ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης επηρεάζει άμεσα τον συντελεστή προσυγκέντρωσης (EF) και την ανάκτηση (R). Η αύξηση του όγκου του επιφέρει

αύξηση της καταβυθιζόμενης οργανικής φάσης (V_{sed}), μείωση της συγκέντρωσης C_{sed} , μείωση του συντελεστή EF και αύξηση της R. Η ιδανική ποσότητα διαλύτη εκχύλισης θα πρέπει να εξασφαλίζει ικανοποιητικές τιμές για τον συντελεστή EF και την R% ενώ ο όγκος της καταβυθιζόμενης φάσης θα πρέπει να είναι αρκετός για την επακόλουθη ανάλυση του [174]. Βιβλιογραφική έρευνα που πραγματοποιήθηκε, έδειξε ότι οι χρησιμοποιούμενοι όγκοι κυμαίνονται από 5 έως 250 μL [171, 173, 175, 176, 177, 178, 179].

2.4.1.4. Όγκος Διαλύτη Διασποράς

Ο όγκος του διαλύτη διασποράς επηρεάζει άμεσα το σχηματισμό του θολώματος στο διάλυμα (τριαδικό σύστημα: νερό - διαλύτης εκχύλισης - διαλύτης διασποράς), τον βαθμό διασποράς του διαλύτη εκχύλισης στην υδατική φάση και την απόδοση της εκχύλισης [174]. Οι αλλαγές που πραγματοποιούνται στον όγκο του, επηρεάζουν τον όγκο του διαλύτη εκχύλισης (V_{sed}). Κρίνεται έτσι ανάγκη η επιλογή της βελτιστής δυνατής ποσότητας ώστε να επιτευχθεί ο μέγιστος όγκος διαλύτη εκχύλισης (V_{sed}). Βιβλιογραφική έρευνα έδειξε τους όγκους να κυμαίνονται από 0.5-2 mL [171, 173, 177, 179, 180, 181].

2.4.1.5. Επίδραση Του Χρόνου Εκχύλισης

Ο χρόνος εκχύλισης είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες σε αρκετές αναλυτικές μεθόδους μικροεκχύλισης όπως SPME και LPME. Στην **DLLME** μέθοδο ως χρόνος εκχύλισης ορίζεται το διάστημα που μεσολαβεί ανάμεσα στον εμβολιασμό του υδατικού διαλύματος από το μίγμα των διαλυτών εκχύλισης / διασποράς και πριν την έναρξη της φυγοκέντρωσης. Μετά τον εμβολιασμό η επιφάνεια επαφής μεταξύ του διαλύτη εκχύλισης και του υδατικού διαλύματος είναι αρκετά μεγάλη (εικόνα 7d). Έτσι η μεταφορά μάζας από την υδατική στην οργανική φάση επιτυγχάνεται ταχύτατα και η ισορροπία του συστήματος επανέρχεται άμεσα. Διαπιστώνεται ότι η επίδραση του χρόνου εκχύλισης στην **DLLME** μέθοδο είναι

μικρής σημασίας αλλά ενδέχεται να επηρεάσει την απόδοση της εκχύλισης. Το βασικό πλεονέκτημα της **DLLME** μεθόδου είναι ο μικρός χρόνος εκχύλισης που απαιτείται συγκριτικά με άλλες μεθόδους [174, 182].

2.4.1.6. Ιοντική Ισχύς

Η επίδραση της ιοντικής ισχύος στην απόδοση της εκχύλισης της **DLLME** μεθόδου ελέγχθηκε με την προσθήκη άλατος π.χ. NaCl. Η διαδικασία αυτή γνωστή ως εξαλάτωση (*salting out effect*), είναι αρκετά περίπλοκη προκαλώντας είτε αύξηση είτε μείωση στην απόδοση της εκχύλισης. Οι Lord και Pawliszyn [183] έχουν αποδώσει αρκετά ικανοποιητικά τις δυο αυτές διαφορετικές συμπεριφορές. Αρχικά, η ενδεχόμενη αύξηση της απόδοσης αποδίδεται στο φαινόμενο της εξαλάτωσης. Στην περίπτωση αυτή, τα μόρια του νερού συναθροίζονται γύρω από το άλας μειώνοντας την δυνατότητα τους να διαλύσουν τα μόρια της αναλυόμενης ουσίας. Έτσι δίνεται η δυνατότητα στον διαλύτη εκχύλισης να παρασύρει περισσότερα μόρια αυξάνοντας τον όγκο της καταβυθιζόμενης φάσης αλλά και την απόδοση. Στον αντίποδα, η ανταγωνιστική διαδικασία που λαμβάνει χώρα προκαλεί μείωση στην απόδοση της μεθόδου. Στην περίπτωση αυτή τα πολικά μόρια της αναλυόμενης ουσίας αλληλεπιδρούν με τα ιόντα του άλατος ηλεκτροστατικά, μειώνοντας την ικανότητα τους να εκχυλιστούν από τον διαλύτη εκχύλισης οδηγώντας σε μείωση του όγκου καταβύθισης [184].

2.4.2. Βελτιστοποίηση Της **DLLME** Μεθόδου

Στόχος της μεθόδου είναι η επίτευξη υψηλών ανακτήσεων με την βελτιστοποίηση των παραπάνω παραγόντων. Η ανάκτηση της μεθόδου (extraction recovery, R%), ο συντελεστής προσυγκέντρωσης (enrichment factor, EF) και η συγκριτική ανάκτηση (relative recovery, RR%) είναι κάποιοι από τους όρους που χρησιμοποιούνται [171]:

Ως συντελεστής προσυγκέντρωσης (EF) ορίζεται η αναλογία ανάμεσα στη συγκέντρωση των αναλυτών στην καταβυθιζόμενη φάση (C_{sed}) και στο αρχικό υδατικό διάλυμα (C_o) (εξίσωση 1):

$$EF = C_{sed} / C_o \quad (1)$$

η C_{sed} προσδιορίζεται από την καμπύλη αναφοράς των ουσιών στον κατάλληλο κάθε φορά διαλύτη εκχύλισης [171].

Ως ανάκτηση της μεθόδου ($R\%$) ορίζεται το επί τις εκατό ποσοστό της συνολικής ποσότητας των moles (n_o) που εκχυλίζονται στην καταβυθιζόμενη φάση από τον διαλύτη εκχύλισης (n_{sed}) (εξίσωση 2):

$$R\% = \frac{n_{sed}}{n_o} \times 100 = \frac{C_{sed} \times V_{sed}}{C_o \times V_o} \times 100 = \left(\frac{V_{sed}}{V_o} \right) EF \times 100 \quad (2)$$

όπου V_{sed} και V_o είναι οι όγκοι στην καταβυθιζόμενη φάση και στο υδατικό αρχικό διάλυμα, αντίστοιχα [171].

Τέλος, η συγκριτική ανάκτηση ($RR\%$) εκφράζεται με την εξίσωση 3:

$$RR\% = \frac{C_{found} - C_{real}}{C_{added}} \times 100 \quad (3)$$

όπου C_{found} , C_{real} και C_{added} είναι η συγκέντρωση των αναλυτών που προσδιορίζεται μετά την προσθήκη γνωστής ποσότητας ουσιών στο πραγματικό δείγμα, η συγκέντρωση των αναλυτών στο πραγματικό δείγμα και η συγκέντρωση που προστίθεται αρχικά στο πραγματικό διάλυμα, αντίστοιχα [171].

2.4.3. Εφαρμογές Της **DLLME** Μεθόδου

2.4.3.1. **DLLME** Σε Συνδυασμό Με GC

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται κυρίως στην **DLLME** μέθοδο είναι αναμίξιμοι με το νερό. Γι αυτό το λόγο η τεχνική που προτιμάται για την ανάλυση της εκχυλιζόμενης φάσης είναι αυτή της αέριας χρωματογραφίας (GC). Οι πολλαπλές εφαρμογές της **DLLME**-GC παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.3.

Η **DLLME** μέθοδος εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τον Rezaee και την ομάδα του [171] σε υδατικά διαλύματα για τον προσδιορισμό των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs). Σύμφωνα με τη μέθοδο, μίγμα 1 mL ακετόνης (διαλύτης διασποράς) και 8 mL C₂Cl₄ (διαλύτης εκχύλισης) εμβολιάστηκε σε υδατικό διάλυμα όγκου 5 mL. Το μίγμα στη συνέχεια αναδεύτηκε και φυγοκεντρήθηκε. Ο όγκος που καταβυθίστηκε (2 mL) εμβολιάστηκε στον αέριο χρωματογράφο για περαιτέρω ανάλυση. Τα αποτελέσματα έδειξαν τον EF να κυμαίνεται από 603 μέχρι 1113, η γραμμικότητα της μεθόδου από 0.02–200 μg L⁻¹ και τα όρια ανίχνευσης (LOD) από 0.007–0.030 μg L⁻¹.

Ο Berijani και η ομάδα του [172] ανέπτυξαν την **DLLME-GC-FPD** μέθοδο για την εκχύλιση μικροβιοκτόνων οργανοφωσφορικής φύσεως (OOPs) από υδατικά διαλύματα. Σε αυτή την περίπτωση μίγμα 12 mL χλωροβενζολίου και 1 mL ακετόνης εμβολιάστηκε σε 5 mL υδατικού διαλύματος. Μετά το τέλος της φυγοκέντησης 0.5 mL χλωροβενζολίου εγχέονται στον αέριο χρωματογράφο. Τα αποτελέσματα έδειξαν τον EF και τις ανακτήσεις (R%) να κυμαίνονται από 789–1070 και 78.9–107%, αντίστοιχα. Η μέθοδος συγκρίθηκε με τις SPME και SDME για την περίπτωση των OOPs και βρέθηκε ότι η **DLLME** είναι απλούστερη, ταχύτερη (χρόνος εκχύλισης λιγότερο από 3 min), με υψηλές ανακτήσεις και EF.

Το 2007, η ερευνητική ομάδα της Kozani R.R. [177] ανέπτυξε την **DLLME** σε συνδυασμό με αέριο χρωματογράφο με ανιχνευτή συλλήψεως ηλεκτρονίων (GC-ECD), για τον προσδιορισμό χλωροβενζολικών ενώσεων (CBs) σε υδατικά διαλύματα.

Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την ευαισθησία της μεθόδου σε συνδυασμό με την ευκολία εφαρμογής της και τα αξιόπιστα αποτελέσματα. Το ίδιο χρόνο, ο Huang και η ομάδα του [180] ανέπτυξαν την **DLLME** μέθοδο, σε Αέριο Χρωματογράφο συζευγμένο με Φασματογράφο Μάζας (GC-MS) για την ανίχνευση τριαζινών από ζιζανιοκτόνα στο νερό, με τις ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις να κυμαίνονται από 0.021–0.12 $\mu\text{g L}^{-1}$. Επιπλέον η **DLLME-GC** σε συνδυασμό με πλήθος ανιχνευτών έχει εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό φθαλικών εστέρων σε υδατικά δείγματα (MS) [185], για τον προσδιορισμό πτητικών φαινολών στο κόκκινο κρασί (MS) [175], για τα εκχυλιζόμενα συστατικά του ρόδου (MS) [186], για την ύπαρξη νιτρο αρωματικών ενώσεων σε υδατικά δείγματα [187], για οργανοχλωριωμένα μικροβιοκτόνα σε υδατικά διαλύματα [188]. Η **DLLME-GC-MS/MS** έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του triclosan (TCS) και του methyltriclosan (MTCS) μετά από παραγοντοποίηση [189]. Τέλος, η συγκριτική μελέτη που πραγματοποιήθηκε ανάμεσα στην HF-LPME και **DLLME** μέθοδο, για την περίπτωση των οργανοθειούχων μικροβιοκτόνων (OSPs), έδειξε σαφή υπεροχή της **DLLME** [190].

Στις περιπτώσεις ισχυρά πολικών και μη πτητικών ενώσεων, στις οποίες δεν είναι εφικτή η απευθείας ανάλυση τους από αέριο χρωματογράφο, κρίνεται απαραίτητη η παραγοντοποίηση τους ώστε να αυξηθεί η πτητικότητα τους. Ο Chiang και η ομάδα του [191] εφάρμοσαν την **DLLME** σε συνδυασμό με GC-MS για τον προσδιορισμό των ανιλινών σε νερά από βιολογικούς καθαρισμούς. Σ' αυτή την περίπτωση, οι ανιλίνες εκχυλίστηκαν με την βοήθεια της μεθόδου και στην συνέχεια υπέστησαν την διαδικασία της παραγοντοποίησης. Ο Fattahi και η ομάδα του [192] προσδιόρισαν την ύπαρξη χλωροφαινολών (CPs) σε υδατικά διαλύματα με τη εφαρμογή της **DLLME** σε συνδυασμό με GC-ECD.

Πίνακας 2.3: Εφαρμογές της *DLLME* σε συνδυασμό με GC.

Ουσίες	Υπόστρωμα	Όγκος διαλύτη εκχύλισης	Όγκος διαλύτη διασποράς	Ανιχνευτής	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Παραπομπή
•PAHs	Νερό	8 $\mu\text{L C}_2\text{Cl}_4$	1mL Ac	FID	0.007–0.030	[171]
•OPPs	Νερό	12 $\mu\text{L C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	1mL Ac	FPD	0.003–0.020	[172]
•Chlorobenzenes	Νερό	9.5 $\mu\text{L C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	0.50 mL Ac	ECD	0.0005–0.050	[177]
•OPPs	Καρπούζι και αγγούρι	27 $\mu\text{L C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	1 mL ACN	FPD	0.010–0.190	[193]
•Trihalomethanes	Πόσιμο νερό	20 $\mu\text{L CS}_2$	0.50 mL Ac	ECD	0.005–0.040	[194]
•Triazine herbicides	Νερό	12 $\mu\text{L C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	1 mL Ac	MS	0.021–0.12	[180]
•Chlorophenols	Νερό	10 $\mu\text{L C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	0.50 mL Ac	ECD	0.010–2.0	[192]
•Phthalate esters	Νερό	9.5 $\mu\text{L C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	0.50 mL Ac	MS	0.002–0.008	[185]
•Organophosphorus flame retardants and plastizicers	Νερό	20 $\mu\text{L 1,1,1-C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3$	1 mL Ac	NPD	0.01–0.08	[195]
•Volatile phenols	Κόκκινο κρασί	50 $\mu\text{L CCl}_4$	1 mL Ac	MS	28–95	[175]

Ουσίες	Υπόστρωμα	Όγκος διαλύτη εκχύλισης	Όγκος διαλύτη διασποράς	Ανιχνευτής	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Παραπομπή
•Chlorophenols <i>(SPE-DLLME)</i>	Νερό	13 $\mu\text{L C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	1 mL Ac	ECD	0.0005–0.1	[196]
•PCBs	Νερό	10 $\mu\text{L C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	0.50 mL Ac	ECD	0.0010–0.0020	[197]
•Amide herbicides	Νερό	25 $\mu\text{L CCl}_4$	0.50 mL Ac	MS	0.003–0.04	[198]
•Butyl και phenyltin ενώσεις	Νερό	11.5 $\mu\text{L CCl}_4$	0.50 mL EtOH	FPD	0.0002–0.001	[199]
•Anilines	Νερό	10 $\mu\text{L C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	0.50 mL Ac	MS	0.04–0.09	[191]
•Organosulfur pesticides και υδατικά δείγματα	Περιβαλλοντικά και υδατικά δείγματα	10 $\mu\text{L CCl}_4$	0.8 mL MeOH	FPD	0.21–3.05	[190]
•Selenium	Νερό	11 $\mu\text{L C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	0.5 mL EtOH	ECD	0.005	[200]
•Amitriptyline, nortriptyline	Νερό	18 $\mu\text{L CCl}_4$	1 mL MeOH	FID	5–10	[201]
•Captan, folpet, captafol	Μήλα	9 $\mu\text{L C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	1 mL Ac	ECD	3.0–8.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[202]

Ουσίες	Υπόστρωμα	Όγκος διαλύτη εκχύλισης	Όγκος διαλύτη διασποράς	Ανιχνευτής	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Παραπομπή
•Phorate	Νερό	-	-	FID	0.001	[203]
•Pyrethroid pesticides	Νερό	10 $\mu\text{L C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	1 mL Ac	ECD	0.04–0.10	[204]
•PCBs	Ψάρια	30 $\mu\text{L C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	1 mL Ac	ECD	0.20–0.50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[205]
•Organochlorine pesticides (<i>DLLME-LSC</i>)	Νερό	5.2 $\mu\text{L C}_2\text{Cl}_4$	7.8 μL βουτυλ-μεθυλ- αιθέρας	MS	0.0008–0.0025	[206]
•Amide herbicides (<i>SPE-DLLME</i>)	Νερό	25 $\mu\text{L CCl}_4$	1 mL Ac	MS	0.002–0.006	[207]
•PBDEs (<i>SPE-DLLME</i>)	Νερό και φυτά	22 $\mu\text{L 1,1,2,2 C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$	1 mL ACN	ECD	0.00003–0.00015	[208]
•PCBs	Έδαφος	30 $\mu\text{L C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	1 mL Ac	ECD	0.20–0.50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[205]
•OPPs	Τσάι	C_6H_{14}	ACN	FPD	0.030–1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[209]
•Fatty acid	Νερό	10 $\mu\text{L CCl}_4$	0.96 mL Ac	FID	0.67–14.5	[210]
•Triclosan, methyltriclosan	Νερό	40 $\mu\text{L CH}_3\text{CCl}_3$	1 mL MeOH	MS/MS	LOQ: 2–5 ng L^{-1}	[189]

Ουσίες	Υπόστρωμα	Όγκος διαλύτη εκχύλισης	Όγκος διαλύτη διασποράς	Ανιχνευτής	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Παραπομπή
•Water-soluble constituents	Αιθέριο έλαιο <i>Rosa damascena</i> <i>Mill</i>	37 $\mu\text{L CHCl}_3$	0.5 mL EtOH	MS	0.001–1.121 mg L^{-1}	[186]
•Chlorothalonil, captan and folpet	Σταφύλι	9 $\mu\text{L C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	1 mL Ac	ECD	6.0–8.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[211]
•Nitroaromatic	Νερό	20 $\mu\text{L CCl}_4$	0.75 mL MeOH	FID	0.09–0.5	[187]
•Organochlorine pesticides	Νερό	10 $\mu\text{L C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$	1 mL Ac	MS	0,001–0,025	[188]
•Methyl tert-butyl ether	Νερό	-	-	FID	0.1	[212]
•Seven fungicides (SPE-DLLME)	Κρασί	0.1mL CH_3CCl_3	1 mL Ac	ECD και MS	-	[213]

2.4.3.2. **DLLME** Σε Συνδυασμό Με HPLC

Η **DLLME** μέθοδος σε συνδυασμό με αέριο χρωματογράφο είναι ακατάλληλη για ενώσεις θερμικά ασταθείς. Πρωτεϊνικά μόρια, απορρυπαντικές και φαρμακευτικές ουσίες που χαρακτηρίζονται ως ημι-πτητικές ή και καθόλου πτητικές αναλύονται με την βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) [182]. Πλήθος ερευνητικών ομάδων έχουν εφαρμόσει την **DLLME** σε συνδυασμό με HPLC, ενδεικτικά αναφέρουμε παρακάτω τις πιο ενδιαφέρουσες. Το 2007 ο Farajzadeh και η ομάδα του [214] ανέπτυξαν την **DLLME-HPLC-DAD**, για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικών ουσιών σε υδατικά διαλύματα. Τα αποτελέσματα ήταν αρκετά ικανοποιητικά, με την ανάκτηση (R%) να κυμαίνεται στο 100% και τα LODs από 3 έως 7 ng mL⁻¹. Ο Wei και η ομάδα του [176] εφάρμοσαν την **DLLME-HPLC-VWD** σε υδατικά διαλύματα. Η μέθοδος συγκρίθηκε με τις SPE, SPME και SDME αποδεικνύοντας ότι ο συνδυασμός της **DLLME** με HPLC-VWD είναι απλός, γρήγορος και χαμηλού κόστους. Το 2008 ο Xia J. και η ομάδα του [215] ανέπτυξαν την **DLLME-HPLC-UV-VIS** για την ανίχνευση του metacrate σε υδατικά διαλύματα. Στην περίπτωση αυτή οι βέλτιστες συνθήκες προσδιορίστηκαν χημειομετρικά. Το 2009, Maleki και η ομάδα του [216] εφάρμοσαν την **DLLME-HPLC-DAD** για τον προσδιορισμό του Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) σε ιζήματα και υδατικά δείγματα. Την ίδια χρονιά, ο Guo J.H. και η ομάδα του [217] ανέπτυξαν την **DLLME-UHPLC-TUV** για τον προσδιορισμό των triclosan (TCS), triclocarban (TCC) και methyltriclosan (M-TCS) σε υδατικά διαλύματα. Η γραμμικότητα της μεθόδου κυμάνθηκε από 0.025–100 μg L⁻¹ ενώ τα LODs από 45.1–236 ng L⁻¹. Στον Πίνακα 2.4 παρουσιάζεται αναλυτικά το πλήθος των εφαρμογών της **DLLME** σε συνδυασμό με HPLC.

Πίνακας 2.4: Εφαρμογές της DLLME σε συνδυασμό με HPLC.

Ουσίες	Υπόστρωμα	Όγκος διαλύτη εκχύλισης	Όγκος διαλύτη διασποράς	Ανιχνευτής	LOD	Παραπομπή
•Antioxidants	Νερό	40 μL CCl_4	2 mL ACN	Photo diode array detector	3–7 ng mL^{-1}	[214]
•Methomyl	Νερό	20 μL $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$	0.50mL MeOH	VWD	1.0 ng mL^{-1}	[176]
•Chloramphenicol	Μέλι	30 μL 1,1,2,2- $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$	1 mL ACN	VWD	0.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[218]
•Clenbuterol	Νερό	25 μL C_2Cl_4	0.5 mL Ac	UV	4.9 ng mL^{-1}	[184]
•Chlorophen oxyacetic acids	Νερό	C_2Cl_4	THF	UV	2.3–3.3 ng mL^{-1}	[184]
•Aromatic amines	Νερό	50 μL [Bmim][PF6]	-	VWD	0.45–2.6 $\mu\text{g L}^{-1}$	[219]
•Pentachlorophenol	Νερό	15 μL C_2Cl_4	1mL Ac	DAD	0.03 $\mu\text{g L}^{-1}$	[220]
•PBDEs	Νερό	20 μL $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$	1 mL ACN	VWD	12.4–55.6 pg mL^{-1}	[181]
•Aromatic amines	Νερό	25 μL $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$	0.5 mL MeOH	VWD	0.8–1.8 ng mL^{-1}	[221]
•Phthalate esters	Νερό	41 μL CCl_4	0.75 mL ACN	VWD	0.64–1.8 ng mL^{-1}	[222]
•Atrazine	Νερό	60 μL CCl_4	550 μL MeOH	UV	0.601 ng mL^{-1}	[223]
•Decabrominated diphenyl ether	Νερό	22 μL $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$	1 mL THF	VWD	0.2 ng mL^{-1}	[224]

Ουσίες	Υπόστρωμα	Όγκος διαλύτη εκχύλισης	Όγκος διαλύτη διασποράς	Ανιχνευτής	LOD	Παραπομπή
•Carbamate pesticides	Νερό	70 μL CHCl_3	1 mL Ac	DAD	0.4–1.0 ng mL^{-1}	[225]
•Benomyl	Νερό	25 μL $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	0.5mL DMF	Fluorescence	0.0033 mg L^{-1}	[226]
•Carbendazim και thiabendazole	Νερό / έδαφος	80 μL CHCl_3	0.75 mL THF	Fluorescence	0.5–1.0 ng mL^{-1} 1.0–1.6 ng g^{-1}	[227]
•Chloramphenicol και thiamphenicol	Νερό	30 μL 1,1,2,2- $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$	1 mL ACN	VWD	0.1–0.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[228]
•Cholesterol	Τροφές	35 μL CCl_4	0.8 mL EtOH	UV	0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$	[229]
•Triazophos and carbaryl pesticides	Νερό / χυμοί φρούτων	15 μL CCl_4	1 mL ACN	Fluorescence	12.3–16.0 pg mL^{-1}	[230]
•7- Aminoflunitrazepam	Ούρα	250 μL CH_2Cl_2	500 μL isopropyl alcohol	Electrospray- tandem mass Spectrometry (ES- MS/MS)	0.025 ng mL^{-1}	[178]
•Psychotropic drugs	Ούρα	20 μL CCl_4	0.5 mL ACN	UV	3–8 ng mL^{-1}	[179]
•PAHs	Νερό και χυμοί φρούτων	16 μL $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$	1 mL ACN	Fluorescence	0.001–0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$	[231]
•Carbamate pesticides	Νερό	40 μL CHCl_3	1 mL ACN	DAD	0.1–0.5 ng mL^{-1}	[225]
•Triclosan, triclocarban, methyltriclosan	Νερό	15 μL $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$	1 mL THF	Tunable ultraviolet detection (TUV)	45.1–236 ng L^{-1}	[217]

Ουσίες	Υπόστρωμα	Όγκος διαλύτη εκχύλισης	Όγκος διαλύτη διασποράς	Ανιχνευτής	LOD	Παραπομπή
•Irganox 1010 and Irgafos 168	Πολυολεφίνες	200 μL CCl_4	2 mL ACN	UV	-	[232]
•Bisphenol A	Νερό	142 μL CHCl_3	2 mL Ac	UV	-	[233]
•Phenoxyacetic acid herbicides	Νερό	25 μL $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	1 mL Ac	DAD	0.16 $\mu\text{g L}^{-1}$	[234]
•EDTA	Νερό	50 μL CCl_4	0.5 mL Ac	DAD	1.7 $\mu\text{g L}^{-1}$	[216]
•Hexanal and heptanal	Ανθρώπινο αίμα	50 μL CCl_4	85 μL ACN	APCI-MS-MS	0.17–0.076 nmol L^{-1}	[235]
•Atrazine και simazine	Νερό	CCl_4	MeOH	-	0.04–0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$	[236]
•Bisphenol A	Νερό	22.5 μL $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	0.5 mL Ac	-	0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$	[238]
•Sulfonylurea herbicides (<i>DSPE-DLLME</i>)	Έδαφος	60 μL $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	Ac	DAD	0.5–1.2 ng g^{-1}	[239]
•Biogenic amines (<i>USA-DLLME</i>)	Δείγματα κρασιού από ρύζι	50 μL $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$	-	Fluorescence	0.02–5 ng mL^{-1}	[240]
•Non-steroidal anti-inflammatory drugs	Δείγματα ούρων	280 μL [Bmim][PF_6]	720 μL MeOH	Single wavelength photometer	8.3–32 ng mL^{-1}	[241]

Ουσίες	Υπόστρωμα	Όγκος διαλύτη εκχύλισης	Όγκος διαλύτη διασποράς	Ανιχνευτής	LOD	Παραπομπή
•PAHs	Νερό	50 μL $[\text{C}_8\text{MIM}][\text{PF}_6]$	1 mL Ac	Fluorescence	LOQ: 0.1–7.0 ng L^{-1}	[242]
•Phenylurea herbicides	Υδατικά δείγματα	CH_2Cl_2	THF	DAD	0.10–0.28 ng mL^{-1}	[243]
•Eight pesticides	Μπανάνες	88 mg $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{PF}_6]$	714 μL MeOH	DAD	0.320–4.66 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[244]
•Dichlorodiphenyl trichloroethane	Νερό	50 μL CCl_4	600 μL ACN	UV	0.32–0.51 $\mu\text{g L}^{-1}$	[245]
•Metacrate	Νερό	116 μL CH_2Cl_2	565 μL MeOH	UV	1 ng mL^{-1}	[215]

2.4.3.3. **DLLME** Σε Συνδυασμό Με Άλλα Όργανα

Εκτός από τις οργανικές ενώσεις η **DLLME** βρίσκει εφαρμογή και σε πλήθος ανόργανων. Πιο συγκεκριμένα, η **DLLME** σε συνδυασμό με φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης (AAS) έχει εφαρμοστεί για την ανίχνευση βαρέων μετάλλων στο υδάτινο περιβάλλον. Σε αυτή την περίπτωση, η μέθοδος, μπορεί να πραγματοποιηθεί με δυο τρόπους: 1) τον σταδιακό και 2) τον ταυτόχρονο. Σύμφωνα με τον πρώτο, αρχικά προστίθεται ο χηλικός παράγοντας και στη συνέχεια το μίγμα των διαλυτών εκχύλισης και διασποράς. Στη δεύτερη περίπτωση, η προσθήκη του χηλικού παράγοντα γίνεται ταυτόχρονα με το μίγμα των διαλυτών εκχύλισης και διασποράς. Στη συνέχεια το μίγμα αναδεύεται σχηματίζοντας το θολό διάλυμα. Σε αυτή τη φάση τα μεταλλικά ιόντα αντιδρούν με τον χηλικό παράγοντα και εκχυλίζονται από τον διαλύτη εκχύλισης. Τέλος το διάλυμα φυγοκεντρείται απομονώνοντας την καταβυθιζόμενη φάση [182].

Η **DLLME-ET-AAS** σε συνδυασμό με φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε σε υδατικά δείγματα για τον προσδιορισμό των βαρέων μετάλλων Au [246], Cd [247], Co [248], Ni [248] και Pb [249]. Η **DLLME-FAAS** (graphite furnace atomic absorption spectrometry) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του Cu [250] και του Pb [251] σε υδατικά δείγματα, με την συμπλοκοποίηση και τη διαδοχική εκχύλιση τους με την χρήση 8-HQ και DDTP, αντίστοιχα. Εν συνέχεια, η Shokoufi και η ομάδα της [252] πρότειναν τον συνδυασμό της **DLLME** με τη φασματοσκοπία FO-LADS (fiber optic-linear array detection spectrophotometry) για την ανίχνευση των Pd και Co σε υδατικά δείγματα, ενώ ο Gharehbaghi και η ομάδα του [253] προσδιόρισαν το Co μετά τη συμπλοκοποίησή του με PAN. Ο Mallah και η ομάδα του εφάρμοσαν την **DLLME** για τον προσδιορισμό των λανθανιδίων samarium (Sm), ευρώπιο (Eu), γαδολίνιο (Gd) και ντισπρόσιο (Dy). Στον Πίνακα 2.5 παρουσιάζονται αναλυτικά όλες οι εφαρμογές.

Πίνακας 2.5: Εφαρμογές της DLLME σε συνδυασμό με άλλα όργανα.

Μέταλλα	Υπόστρωμα	Όγκος διαλύτη εκχύλισης	Όγκος διαλύτη διασποράς	Ανιχνευτής	Χηλικός παράγοντας	LOD	Παραπομπή
•Cd	Νερό	34 μL CCl_4	0.5 mL MeOH	GF AAS	APDC ^a	0.6 ng L^{-1}	[247]
•Se	Νερό	35 μL CCl_4	0.5 mL EtOH	GF AAS	APDC	0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$	[254]
•Pd και Co	Νερό	70 μL $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$	0.4 mL EtOH	FO-LADS ^b	PAN ^c	0.2–0.25 $\mu\text{g L}^{-1}$	[252]
•Pb	Νερό	35 μL CCl_4	0.5 mL Ac	ET AAS	DDTP ^d	0.02 $\mu\text{g L}^{-1}$	[249]
•Pb	Βιολογικά/υδατικά δείγματα	40 μL CCl_4	0.5 mL EtOH	GF AAS	PMBP ^e	39 ng L^{-1}	[255]
•Pb	Νερό	52 μL CCl_4	2.5 mL MeOH	F AAS	DDTP	0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$	[251]
•Sm, Eu, Gd, Dy	Νερό	400 μL CHCl_3	10 mL MeOH	ICP-OES	PAN	-	[256]
•Cu(II)	Νερό	250 μL CHCl_3	1.5 mL MeOH	F AAS	8-Hydroxy quinoline	3 $\mu\text{g L}^{-1}$	[250]
•As, Sb	Νερό	50 μL CCl_4	0.4 mL MeOH	ET AAS	APDC	0.01–0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$	[257]
•As(III), As(V)	Νερό	35 μL CCl_4	0.5 mL MeOH	GF AAS	APDC	36 ng L^{-1}	[258]
•Pb	Νερό	40 μL CCl_4	0.5 mL EtOH	F AAS	DDTC ^f	2.4 ng L^{-1}	[259]
•Cr	Νερό	60 μL CCl_4	2 mL EtOH	GF AAS	APDC	0.07 $\mu\text{g L}^{-1}$	[260]
•Cu, Pb	Νερό	xylene	MeOH	F AAS	Ammonium diethyldithiophosphate	0.04 $\mu\text{g L}^{-1}\text{Cu(II)}$ 0.54 $\mu\text{g L}^{-1}\text{Pb(II)}$	[261]

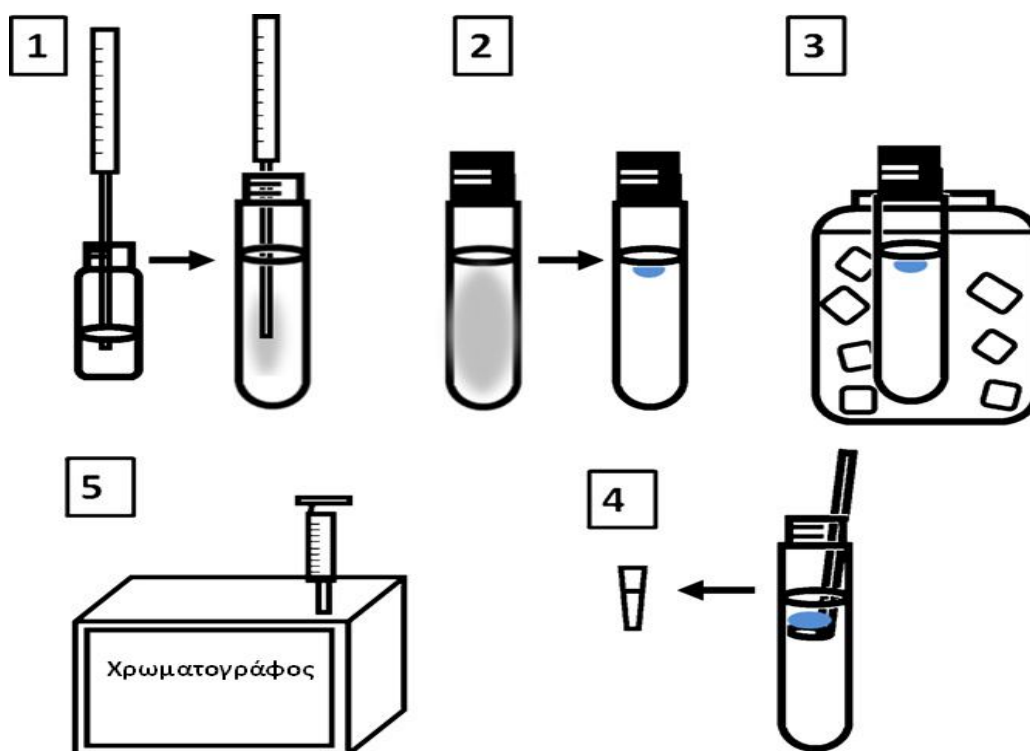
Μέταλλα	Υπόστρωμα	Όγκος διαλύτη εκχύλισης	Όγκος διαλύτη διασποράς	Ανιχνευτής	Χηλικός παράγοντας	LOD	Παραπομπή
•Pd	Νερό	150 μL CHCl_3	1.5 mL EtOH	F AAS	TRH ^g	90 $\mu\text{g L}^{-1}$	[262]
•Sm, Eu, Gd, Dy	Σκόνη διοξειδίου του ουρανίου	600 μL ionic liquid	8 mL MeOH	ICP-OES	HYD ^h	0.34 -1.29 $\mu\text{g L}^{-1}$	[263]
•NO ₂ ⁻	Περιβαλλοντικά / βιολογικά δείγματα	CCl ₄	EtOH	Digital colorimetry	P-Nitro-aniline and diphenyl amine	0.22 $\mu\text{g L}^{-1}$	[264]
•Cd(II)	Νερό	34 μL CCl ₄	0.5 mL MeOH	GF AAS	Salen(N,N-bis salicylidene)- ethylene diamine	0.5 ng L ⁻¹	[265]
•Co	Νερό	CHCl ₃	EtOH	Spectrophotometer	PAN	0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$	[266]
•Co, Ni	Δείγματα νερού και ρυζιού	15 μL CCl ₄	1 mL Ac	GF AAS	PAN	21 pg mL ⁻¹ Co 33 pg mL ⁻¹ Ni	[248]
•Co	Νερό	50 μL CCl ₄	2 mL MeOH	F AAS	Br-TAO	0.9 $\mu\text{g L}^{-1}$	[267]
•Pb, Cd	Νερό	50 μL CCl ₄	0.4 mL MeOH	ET AAS	APDC	10 ng L ⁻¹ Pb 4 ng L ⁻¹ Cd	[268]
•Ag	Νερό	15 μL CCl ₄	0.5 mL EtOH	FAAS	-	1.2 ng mL ⁻¹	[269]

^a APDC =Ammonium pyrrolidine dithiocarbamate , ^b FO-LADS = Fiber optic-linear array detection spectrophotometry, ^c PAN=1-(2- Pyridylazo)-2- naphthol, ^d DDTP = Diethyldithiophosphoric acid , ^e PMBP =1-Phenyl-3-methyl-4-benzoyl-5-pyrazolone, ^f DDTC = Diethyl dithiocarbamate, ^g TRH = Thioridazine HCl, ^h HYD = 1-Hydroxy-2,5-pyrrolidinedione.

2.5. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς Βασιζόμενη Στην Στερεοποίηση Της Επιπλέουσας Οργανικής Φάσης (**DLLME-SFO**)

Η **DLLME** είναι μια σύγχρονη μέθοδος με πολλά πλεονεκτήματα και με μοναδικό μειονέκτημα τη φύση του διαλύτη εκχύλισης. Οι επιλεγόμενοι διαλύτες π.χ. CHCl_3 , CCl_4 , με πυκνότητα μεγαλύτερη από αυτή του νερού, είναι αρκετά τοξικοί και επιβλαβείς για τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Γι αυτούς τους λόγους, το 2008 ο Huang και η ομάδα του [270] ανέπτυξαν μια νέα αναλυτική μέθοδο στηριζόμενη στις βασικές αρχές των **DLLME** και LLME-SFO [271, 272]. Η νέα αυτή μέθοδος ονομάστηκε *υγρή υγρή μικροεκχύλιση διασποράς βασιζόμενη στην στερεοποίηση της επιπλέουσας οργανικής φάσης (DLLME-SFO)*. Το κύριο χαρακτηριστικό της που την διαφοροποιεί από την **DLLME** είναι ο διαλύτης εκχύλισης. Στην **DLLME-SFO** οι διαλύτες χαρακτηρίζονται από χαμηλή τοξικότητα και πυκνότητα μικρότερη από αυτή του νερού (π.χ. 1-δωδεκανόλη, 1-εντεκανόλη κ.τ.λ.).

Σε αυτή τη μέθοδο, το κατάλληλο μίγμα διαλυτών εκχύλισης και διασποράς εμβολιάζεται εντός του υδατικού διαλύματος (εικόνα 8.1). Το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς σχηματίζοντας ένα θόλωμα (σταγόνες διαλύτη εκχύλισης). Σε αυτή τη φάση η επιφάνεια επαφής ανάμεσα στο υδατικό διάλυμα και τις σταγόνες του διαλύτη εκχύλισης είναι αρκετά μεγάλη επιταχύνοντας την μεταφορά μάζας από το διάλυμα στον διαλύτη εκχύλισης (εικόνα 8.2). Το διάλυμα φυγοκεντρείται και τοποθετείται σε παγόλουτρο για 5 λεπτά (εικόνα 8.3). Ο διαλύτης εκχύλισης (π.χ. 1-δωδεκανόλη) ψύχεται και στερεοποιείται στην επιφάνεια του διαλύματος. Στη συνέχεια απομακρύνεται και τοποθετείται σε ειδικό δοχείο ώστε να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου στην αρχική του κατάσταση (εικόνα 8.4) και εγχέεται στον κατάλληλο χρωματογράφο (εικόνα 8.5). Η μέθοδος προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα όπως είναι: η ευκολία εφαρμογής της, η ταχύτητα εκτέλεσης της, το χαμηλό κόστος, οι υψηλές ανακτήσεις και η χαμηλή τοξικότητα των διαλυτών εκχύλισης [273]. Στην εικόνα 8 παρουσιάζεται αναλυτικά η πορεία διεξαγωγής της **DLLME-SFO** μεθόδου.



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση: (1) προετοιμασία και εμβολιασμός του κατάλληλου μίγματος, (2) σχηματισμός θολώματος και φυγοκέντρωση, (3) παγόλουτρο, (4) απομάκρυνση του διαλύτη εκχύλισης, (5) εισαγωγή στον κατάλληλο χρωματογράφο.

2.5.1. Βελτιστοποίηση Της **DLLME-SFO** Μεθόδου

Ο συντελεστής προσυγκέντρωσης (EF) ορίζεται ως η αναλογία ανάμεσα στη συγκέντρωση των αναλυτών στην επιπλέουσα φάση (C_{floated}) και στο αρχικό υδατικό διάλυμα (C_o) όπως παρουσιάζεται στην εξίσωση 4:

$$EF = \frac{C_{\text{floated}}}{C_o} \quad (4)$$

η C_{floated} προσδιορίζεται από την καμπύλη αναφοράς των ουσιών στον κατάλληλο κάθε φορά διαλύτη εκχύλισης [274].

Η ανάκτηση της εκχύλισης της μεθόδου (R%) ορίζεται ως το επί τις εκατό ποσοστό της συνολικής ποσότητας των moles (n_o) που εκχυλίζονται στην επιπλέουσα φάση από τον διαλύτη εκχύλισης (n_{floated}) όπως παρουσιάζεται στην εξίσωση 5:

$$R\% = \frac{n_{\text{floated}}}{n_o} \times 100 = \frac{C_{\text{floated}} \times V_{\text{floated}}}{C_o \times V_o} \times 100 = \left(\frac{V_{\text{floated}}}{V_o} \right) EF \times 100 \quad (5)$$

όπου V_{floated} και V_o είναι οι όγκοι στην επιπλέουσα φάση και το υδατικό αρχικό διάλυμα, αντίστοιχα [274].

Τέλος, η συγκριτική ανάκτηση (RR%) εκφράζεται με την εξίσωση 6:

$$RR\% = \frac{C_{\text{found}} - C_{\text{real}}}{C_{\text{added}}} \times 100 \quad (6)$$

όπου C_{found} , C_{real} και C_{added} είναι η συγκέντρωση των αναλυτών που προσδιορίζεται μετά την προσθήκη γνωστής ποσότητας ουσιών στο πραγματικό δείγμα, η συγκέντρωση των αναλυτών στο πραγματικό δείγμα και η συγκέντρωση που προστίθεται αρχικά στο πραγματικό διάλυμα, αντίστοιχα [274].

2.5.2. Παράγοντες Που Επηρεάζουν Την **DLLME-SFO**

Όπως και στην **DLLME** μέθοδο έτσι και στην **DLLME-SFO** οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης είναι: i) ο διαλύτης εκχύλισης, ii) ο διαλύτης διασποράς, iii) ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης, iv) ο όγκος του διαλύτη διασποράς, v) ο χρόνος της εκχύλισης και vi) η ιοντική ισχύς. Οι προαναφερθέντες παράγοντες εκτός του διαλύτη εκχύλισης επηρεάζουν την **DLLME-SFO** με τον ίδιο τρόπο που έχουμε αναφέρει στην περίπτωση της **DLLME**. Γι αυτό το λόγω παρακάτω θα αναφερθούμε εκτενέστερα μόνο στον διαλύτη εκχύλισης και στον όγκο του.

2.5.2.1. Επιλογή Διαλύτη Εκχύλισης

Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης είναι ζωτικής σημασίας για την **DLLME-SFO** μέθοδο, γι αυτό το λόγο θα πρέπει να πληροί τις παρακάτω προϋποθέσεις [275]:

- ☞ να έχει μικρή διαλυτότητα στο νερό,
- ☞ να έχει τη δυνατότητα να εκχυλίζει τις προς ανάλυση ουσίες,
- ☞ το σημείο τήξεως του να είναι χαμηλό και κοντά στη θερμοκρασία δωματίου,
- ☞ η πυκνότητα του να είναι μικρότερη από αυτή του νερού επιτρέποντας τον διαχωρισμό του από το υδατικό διάλυμα μετά την φυγοκέντρηση,
- ☞ να έχει καλή χρωματογραφική του συμπεριφορά,
- ☞ να έχει μικρή τοξικότητα.

Οι παραπάνω προϋποθέσεις πληρούνται ικανοποιητικά από διαλύτες όπως είναι: η 1-εντεκανόλη (1-UD-OH), η 1-δωδεκανόλη (1-DD-OH), η 2-δωδεκανόλη (2-DD-OH) και το *n*-εξαδεκάνιο (*n*-HD). Στον Πίνακα 2.6 παρουσιάζονται αναλυτικά οι φυσικές ιδιότητες τους.

Πίνακας 2.6: Φυσικές ιδιότητες των διαλυτών εκχύλισης [270].

Διαλύτες εκχύλισης	Σημείο τήξεως (°C)	Σημείο βρασμού (°C)	Πυκνότητα (g mL ⁻¹)
1-UD-OH	13-15	243	0.83
1-DD-OH	22-24	259	0.83
2-DD-OH	17-18	249	0.80
<i>n</i> -HD	18	287	0.77

2.5.2.2. Όγκος Διαλύτη Εκχύλισης

Ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης επηρεάζει άμεσα την ανάκτηση της εκχύλισης (R%). Η αύξηση του όγκου του επιφέρει αύξηση της επιπλέουσας οργανικής φάσης,

με επακόλουθη αύξηση της ανάκτησης (R%). Περαιτέρω αύξηση του όγκου πιθανόν να επιφέρει μείωση της ανάκτησης λόγω αραίωσης του δείγματος [276]. Η ιδανική ποσότητα διαλύτη εκχύλισης θα πρέπει να εξασφαλίζει αυξημένες τιμές ανακτήσεων και ο όγκος καταβύθισης μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης να είναι αρκετός για την επακόλουθη ανάλυση του.

2.5.3. Εφαρμογές Της **DLLME-SFO** Μεθόδου

Η **DLLME-SFO** μέθοδος είναι μια σύγχρονη αναλυτική μεθοδολογία που εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 2008 από τον Huang και την ομάδα του [270], όπως έχουμε ήδη αναφέρει, σε υδατικά διαλύματα για τον προσδιορισμό αλογονόμενων οργανικών ενώσεων (HOCs) σε συνδυασμό με GC/MS. Το 2009 η ίδια ερευνητική ομάδα [274], ανέπτυξε την **DLLME-SFO** σε συνδυασμό με GC/ECD για τον προσδιορισμό οργανοχλωριωμένων μικροβιοκτόνων (OCPs) σε υδατικά διαλύματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν τις ανακτήσεις να κυμαίνονται από 82.9–102.5 %, τα όρια ανίχνευσης (LODs) από 0.011 έως 0.11 $\mu\text{g L}^{-1}$ και την γραμμικότητα από 0.025–20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Την ίδια χρονιά, ο Xu και η ομάδα του [275] προσδιόρισαν σε περιβαλλοντικά υδατικά δείγματα πέντε είδη πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs). Η μέθοδος συγκρινόμενη με άλλες πρότυπες μεθόδους όπως την LPME, υπέδειξε καλύτερα αποτελέσματα σε συντομότερο χρονικό διάστημα. Τέλος, το 2010 οι Chang και Huang [277] ανίχνευσαν ορμόνες στεροειδούς φύσεως σε νερά ποταμών και βρύσης. Οι ανακτήσεις κυμαίνονταν από 87 έως 116% για τα νερά των ποταμών και από 89 έως 102 % για το νερό βρύσης, ενώ τα όρια ανίχνευσης (LODs) σε $\mu\text{g L}^{-1}$. Μέχρι τώρα έχουμε αναφερθεί μόνο σε περιβαλλοντικά δείγματα, η μέθοδος όμως βρίσκει εφαρμογή και σε βιολογικά δείγματα. Το 2010 η Lili και η ομάδα της [278] εφάρμοσαν την μέθοδο σε δείγματα ανθρώπινου αίματος για τον προσδιορισμό των ουσιών hexanal και heptanal. Τα αποτελέσματα της μεθόδου ήταν αρκετά ικανοποιητικά με τα LODs της να κυμαίνονται από 7.90 και 2.34 nmol L^{-1} και τις ανακτήσεις να υπολογίζονται στο 70 %. Τέλος η μέθοδος έχει εφαρμοστεί και για την

ανίχνευση των μεταλλικών ιόντων Cu, Co, Cr και Mn σε υδατικά δείγματα με τα LODs να κυμαίνονται από 0.1 έως 0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$. Όπως μπορούμε να διαπιστώσουμε από την βιβλιογραφική έρευνα που πραγματοποιήθηκε, λίγες εργασίες έχουν δημοσιευτεί καθιστώντας την νέα αυτή μέθοδο αρκετά ελκυστική για περαιτέρω διερεύνηση.

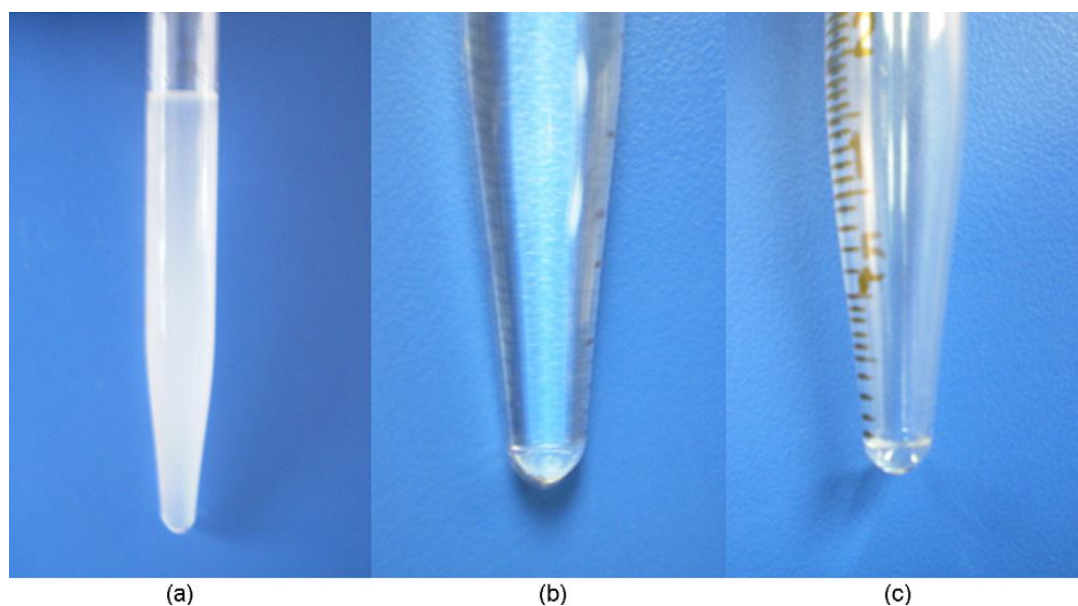
2.6. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς Συνδυαζόμενη Με Ιοντικό Διαλύτη Υγρής Φύσεως (IL-DLLME)

Η *υγρή υγρή μικροεκχύλιση διασποράς συνδυαζόμενη με ιοντικό διαλύτη υγρής φύσεως (IL-DLLME)* είναι μια νέα αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε για να αντικαταστήσει τους επιβλαβείς αλογονωμένους διαλύτες της **DLLME**. Ο Zhu και η ομάδα του [219] χρησιμοποίησαν γι αυτό το λόγο διαλύτες ιοντικής φύσεως, τους λεγόμενους *Room temperature ionic liquids*, RTILs. Οι RTILs είναι ένα σύστημα αλάτων η σύνθεση του οποίου αποτελείται από κατιόντα οργανικής φύσεως και ανιόντα οργανικής ή ανόργανης φύσεως [279]. Στην βιβλιογραφία [280, 281] παρουσιάζονται συχνά ως «πράσινοι διαλύτες» και χρησιμοποιούνται ευρέως στην σύνθεση [282], στην κατάλυση [283, 284], στον διαχωρισμό [285] και στην ηλεκτροχημεία [286] λόγω των μοναδικών τους ιδιοτήτων. Χαρακτηρίζονται για την χαμηλή πτητικότητα τους, τη χημική και θερμική σταθερότητα τους και τη ικανοποιητική διαλυτότητα των οργανικών και ανόργανων συστατικών τους [279]. Βασικό μειονέκτημα τους είναι το υψηλό τους κόστος. Στον Πίνακα 2.7 αναφέρονται οι φυσικές ιδιότητες ορισμένων RTILs ενώ στην εικόνα 9 παρουσιάζεται η πορεία της IL-DLLME.

Πίνακας 2.7: Φυσικές ιδιότητες των RTILs.

Διαλύτες	Σ.Β. ^α (°C)	Τ.Α. ^β (Torr)	Διαλυτότητα ^γ (mg L ⁻¹)	Πυκνότητα (g cm ⁻³)	Ιξώδες (cP)	Ε.Τ. ^δ (dyn cm ⁻¹)
[C ₄ MIM][PF ₆]	-	-	18800	1.36–1.37	148–450	48.8–49.8
[C ₆ MIM][PF ₆]	-	-	7500	1.29–1.31	560–586	-
[C ₈ MIM][PF ₆]	-	-	2000	1.20–1.23	682–710	34.2–36.5
[C ₆ MIM][Tf ₂ N]	-	-	3400	1.33	-	-

^α Σ. Β. = Σημείο Βρασμού, ^β Τ.Α. = Τάση Ατμών, ^γ Διαλυτότητα στο νερό, ^δ Ε.Τ. =Επιφανειακή Τάση



Εικόνα 9: Πορεία IL-DLLME: (a) μετά την προσθήκη και την ανάδευση του μίγματος IL-διαλύτη διασποράς, (b) μετά τη φυγοκέντρωση, (c) μετά την αφαίρεση της υδατικής φάσης.

Η μέθοδος έχει εφαρμοστεί για την εκχύλιση και προσυγκέντρωση λανθανιδίων [263], PAHs [242], οργανοφωσφωρικών μικροβιοκτόνων σε υδατικά διαλύματα [287] και μικροβιοκτόνων που εντοπίζονται στην μπανάνα [244].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ

3.1. Εισαγωγή

Ο όρος χημειομετρία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1972 από τον Σουηδό καθηγητή *Svante Wold* της Οργανικής Χημείας του πανεπιστημίου *Umea University* της Σουηδίας και τον Αμερικανικής καταγωγής καθηγητή *Bruce R. Kowalski* της Αναλυτικής Χημείας του πανεπιστημίου *University of Washington* του Σιατλ. Οι δυο τους, τον Ιούνιο του 1974 ίδρυσαν την «Διεθνή Κοινωνία της Χημειομετρίας» (*International Chemometrics Society*) με τον Kowalski να δημοσιεύει ένα χρόνο μετά την πρώτη επιστημονική εργασία. Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του '80 τρία νέα επιστημονικά περιοδικά εμφανίστηκαν στο συγκεκριμένο πεδίο: το *Journal of Chemometrics*, το *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* και το *Journal of Chemical Information and Modeling* [288] .

Τι είναι όμως η χημειομετρία με την ευρύτερη έννοια; Πολλοί ορισμοί έχουν αποδοθεί με τους κυριότερους να αναφέρονται παρακάτω:

- "Χημειομετρία είναι η χρήση μαθηματικών και στατιστικών μεθόδων για το χειρισμό, την ερμηνεία και την πρόβλεψη χημικών δεδομένων [289]."
- "Χημειομετρία είναι η διαδικασία με την οποία τα δεδομένα (π.χ. οι αριθμοί σε ένα Πίνακα) μετατρέπονται σε πληροφορίες οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη λήψη αποφάσεων [290]."
- "Η χημειομετρία αποτελεί ένα παρακλάδι της αναλυτικής χημείας, στο οποίο χρησιμοποιούνται μαθηματικές και στατιστικές μέθοδοι για:
 - i. τον σχεδιασμό μίας πειραματικής διαδικασίας ή την επιλογή των βέλτιστων πειραματικών διαδικασιών,
 - ii. την επεξεργασία των χημικών δεδομένων για την απόκτηση γνώσεων σχετικά με τα χημικά συστήματα [291].

Η επιστήμη της χημειομετρίας αναπτύχθηκε ταχύτατα λόγω της ευρείας ανάπτυξης των υπολογιστών αλλά και των σύγχρονων αναλυτικών τεχνικών. Τα κύρια πεδία έρευνας σήμερα είναι:

- ✓ Βασική στατιστική

- ✓ Βελτιστοποίηση της μεθόδου
- ✓ Πειραματικός σχεδιασμός
- ✓ Βαθμονόμηση
- ✓ Παραγοντική ανάλυση
- ✓ Διαχωρισμός
- ✓ Ανίχνευση
- ✓ Επεξεργασία σήματος
- ✓ Νευρωνικά δίκτυα

Η χημειομετρία έχει βρει πρόσφορο έδαφος σε πολλούς τομείς της Χημείας μεταξύ των οποίων είναι η Αναλυτική και Οργανική Χημεία, η Χημεία των τροφίμων καθώς και ο τομέας της Ιατρικής και του Περιβάλλοντος [292]. Τα πολλά πεδία στα οποία έχει διεισδύσει η χημειομετρία την καθιστούν ως διεπιστημονική. Στις ενότητες που ακολουθούν θα αναφερθούμε εκτενέστερα στις χημειομετρικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την βελτιστοποίηση των δυο αναλυτικών μεθόδων, **DLLME** και **DLLME-SFO**, κατά τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής.

3.2. Εισαγωγή Στην Στατιστική Ανάλυση

Κατά την επανάληψη μιας πειραματικής διαδικασίας με τη χρήση του ίδιου δείγματος συνήθως οι τιμές που λαμβάνονται δεν είναι ίσες μεταξύ τους αλλά εμφανίζουν κάποια διακύμανση. Η διακύμανση μεταξύ των τιμών ενδέχεται να οφείλεται σε τυχαία σφάλματα (*random errors*) ή σε συστηματικά σφάλματα (*determinate errors*).

Σύμφωνα με το *Ελληνικό Κείμενο Κοινοτικής Οδηγίας (2002/657/EK)* τα χαρακτηριστικά ποιότητας μιας αναλυτικής μεθοδολογίας θα πρέπει να είναι:

- **Accuracy:** Ακρίβεια
- **Trueness:** Ορθότητα
- **Precision:** Πιστότητα
- **Repeatability:** Επαναληψιμότητα

- **Reproducibility:** Αναπαραγωγικότητα
- **Intra-laboratory:** Ενδοεργαστηριακή
- **Inter-laboratory:** Διεργαστηριακή
- **Ruggedness:** Ανθεκτικότητα
- **Detectability:** Ανιχνευσιμότητα
- **Detection Limit:** Όριο Ανίχνευσης
- **Quantitation Limit:** Όριο Ποσοτικοποίησης
- **Specificity / Selectivity:** Ειδικότητα / Εκλεκτικότητα
- **Sensitivity:** Ευαισθησία
- **Linearity:** Γραμμικότητα
- **Working Range:** Περιοχή Εργασίας

Κατά την πραγματοποίηση μιας χημικής ανάλυσης δυο είναι οι βασικοί στόχοι: η ακρίβεια ή ορθότητα της ανάλυσης (*accuracy or trueness*) και η πιστότητα της ανάλυσης (*precision*). Με τον όρο *ορθότητα* εννοούμε τον ορθό προσδιορισμό της συγκέντρωσης ενός άγνωστου δείγματος και αναφέρεται στη διαφορά μεταξύ της μέσης τιμής μιας σειράς μετρήσεων και της πραγματικής τιμής της μετρούμενης ποσότητας. Η πραγματική τιμή υπολογίζεται από το αποτέλεσμα μιας άλλης μεθόδου γνωστής ορθότητας. Με τον όρο *πιστότητα* εννοούμε τον επαναλαμβανόμενο ορθό προσδιορισμό της συγκέντρωσης ενός δείγματος. Η πιστότητα της μεθόδου επηρεάζεται σημαντικά από τα τυχαία σφάλματα γι' αυτό και θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη προσοχή. Για να ελεγχθεί η ύπαρξη των τυχαίων σφαλμάτων στη μέθοδο μπορεί να εκτιμηθεί είτε η επαναληψιμότητα (*repeatability*) είτε η αναπαραγωγικότητα (*reproducibility*). Με τον όρο *επαναληψιμότητα* ορίζεται η πραγματοποίηση της ίδιας πειραματικής διαδικασίας σε διαφορετικά δείγματα του ίδιου πληθυσμού, την ίδια ημέρα. Αντίθετα, ο όρος *αναπαραγωγικότητα* αναφέρεται στην πραγματοποίηση της ίδιας πειραματικής διαδικασίας στο ίδιο δείγμα είτε διαφορετικές μέρες, οπότε οι συνθήκες εκτέλεσης του πειράματος θεωρούνται αλλαγμένες, είτε ακόμα και από διαφορετικό χημικό

εργαστήριο ή αναλυτή. Με την επανάληψη των μετρήσεων είναι δυνατό να επιτευχθεί καλύτερη πιστότητα της μεθόδου.

Για να αναπτύξουμε μια νέα αναλυτική μεθοδολογία, ώστε να προσδιορίσουμε την συγκέντρωση κάποιου νέου στοιχείου, θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στην επίτευξη υψηλής ορθότητας και πιστότητας της μεθόδου. Ένα επιπλέον ζητούμενο στην ανάπτυξη μιας νέας αναλυτικής μεθόδου είναι η υψηλή ευαισθησία (*sensitivity*) και τα χαμηλά όρια ανίχνευσης (*limit of detection, LOD*) και ποσοτικού προσδιορισμού. Η ευαισθησία της μεθόδου ορίζεται ως η κλίση της καμπύλης αναφοράς της μεθόδου και εκφράζει τη μεταβολή του μετρούμενου μεγέθους ή σήματος ή ιδιότητας, ανά μονάδα μεταβολής της συγκέντρωσης του προσδιοριζόμενου στοιχείου. Ως όριο ανίχνευσης χαρακτηρίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση της προς ανάλυση ουσίας, η οποία μπορεί να ανιχνευτεί με βεβαιότητα 99,6%.

Η βελτιστοποίηση της μεθόδου, δηλαδή ο έλεγχος και η ανεύρεση των συνθηκών κάτω από τις οποίες λαμβάνονται τα πιο ορθά και ακριβή αποτελέσματα, επιτυγχάνεται με τον προσδιορισμό των παραπάνω χαρακτηριστικών. Κρίνεται λοιπόν απαραίτητο να πραγματοποιηθεί σύγκριση μεταξύ των πειραματικών τιμών που λαμβάνονται κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Η σύγκριση πραγματοποιείται με τις μέσες τιμές των δυο πληθυσμών. Από τα αποτελέσματα είναι δυνατό να προκύψει είτε σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο αυτών τιμών, οπότε οι διαφορετικές συνθήκες διενέργειας του πειράματος επηρεάζουν την μέθοδο, είτε να μην διαφέρουν μεταξύ τους.

3.2.1. Δοκιμασία Student (t-Test)

Οι δοκιμασίες student χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της τυπικής απόκλισης (s) (από μικρό πληθυσμιακό δείγμα) και όχι την πραγματική τιμή της τυπικής απόκλισης (σ). Οι δοκιμασίες αυτού του τύπου, γνωστές και ως *t-test*, είναι από τις πλέον απλές στατιστικές δοκιμασίες και συγχρόνως είναι οι πλέον

συνηθισμένες στην αξιολόγηση αναλυτικών μεθόδων και μετρήσεων. Με τις δοκιμασίες αυτές μπορούν να απαντηθούν ερωτήματα όπως:

1. Αν η μέση τιμή μιας σειράς μετρήσεων διαφέρει σημαντικά από την αποδεκτή (ή πραγματική) τιμή του δείγματος;
2. Αν οι μέσες τιμές δύο σειρών μετρήσεων διαφέρουν σημαντικά;

Υπάρχουν τρεις τρόποι με τους οποίους μπορεί να χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία t:

1) Σύγκριση πειραματικής τιμής $\bar{x}$ με την αληθινή τιμή μ : Ο έλεγχος μιας μεθόδου συνήθως γίνεται με τη χρησιμοποίηση της, σε μια σειρά αναλύσεων πρότυπου δείγματος, συγκρίνοντας την τιμή $\bar{x}$ με την αληθινή τιμή, μ . Η σύγκριση της $\bar{x}$ με τη μ γίνεται υπολογίζοντας την τιμή t από την εξίσωση 7:

$$t = \frac{|\mu - \bar{x}| \sqrt{N}}{s} \quad (7)$$

και συγκρίνεται με τη θεωρητική τιμή του t (Πίνακας 3.1). Όταν $t_{\text{πειραματικό}} > t_{\text{θεωρητικό}}$ συμπεραίνεται ότι υπάρχει σημαντική διαφορά (συστηματικό σφάλμα) μεταξύ $\bar{x}$ και μ . Όταν $t_{\text{πειραματικό}} < t_{\text{θεωρητικό}}$, η διαφορά $|\bar{x} - \mu|$ θεωρείται μηδαμινή και αποδίδεται σε τυχαία σφάλματα

2) Σύγκριση δυο μέσων πειραματικών τιμών $\bar{x}_1$ και $\bar{x}_2$ (δοκιμασία t): Η σύγκριση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με δυο διαφορετικές μεθόδους ή από δυο άτομα ή από το ίδιο άτομο αλλά με διαφορετικές συνθήκες ή τεχνικές επιτυγχάνεται με τη σύγκριση των δυο πειραματικών τιμών $\bar{x}_1$ και $\bar{x}_2$ με τη βοήθεια της δοκιμασίας t. Ο υπολογισμός του $t_{\text{πειραματικό}}$ γίνεται με την εξίσωση 8 [293]:

$$t_{\text{πειραματικό}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_{1-2}} \sqrt{\frac{N_1 N_2}{N_1 + N_2}} \quad (8)$$

όπου s_{1-2} είναι η τυπική απόκλιση οποιασδήποτε τιμής σε καθεμία από τις δυο σειρές δεδομένων, που υπολογίζεται με την εξίσωση 9 [293]:

$$s_{1-2} = \sqrt{\frac{\sum (x_{i1} - \bar{x})^2 + \sum (x_{i2} - \bar{x}_2)^2}{N_1 + N_2 - 2}} = \sqrt{\frac{S_1^2(N_1 - 1) + S_2^2(N_2 - 1)}{N_1 + N_2 - 2}} \quad (9)$$

Στην περίπτωση όπου $N_1 = N_2 = N$, η εξίσωση 8 απλοποιείται στην εξίσωση 10 [293]:

$$t_{\text{πειραματικό}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_{1-2}} \sqrt{N/2} \quad (10)$$

και η εξίσωση 9 απλοποιείται στην εξίσωση 11:

$$s_{1-2} = \sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2}{2}} \quad (11)$$

Η υπολογιζόμενη τιμή $t_{\text{πειραματική}}$ συγκρίνεται με τις θεωρητικές τιμές του $t_{\text{θεωρητικό}}$ (στατιστικός Πίνακας 3.1), για $N_1 + N_2 - 2$ βαθμούς ελευθερίας και προκαθορισμένη στάθμη εμπιστοσύνης, όπως ακριβώς κατά τη σύγκριση μιας μέσης τιμής $\bar{x}$ προς την αληθινή τιμή μ .

3) Δοκιμασία t για παρατηρήσεις κατά ζεύγη ή κατά ζεύγη δοκιμασία t (paired t -test): Η σύγκριση των δειγμάτων που αναλύονται με δυο διαφορετικές μεθόδους, προκειμένου να συγκριθούν για την ισοδυναμία τους, γίνεται ανά ζεύγη ενώ η τιμή του $t_{\text{πειραματικό}}$ υπολογίζεται από την εξίσωση 12:

$$t_{\text{πειραματικό}} = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B|}{s_d} \sqrt{\frac{N(N-1)}{\sum (d_i - \bar{d})^2}} = \frac{\bar{d} \sqrt{N}}{s_d} \quad (12)$$

όπου $\bar{x}_A$ και $\bar{x}_B$ είναι η μέση τιμή των αναλύσεων των δειγμάτων που αναλύθηκαν με τη μέθοδο Α και Β, αντίστοιχα, Ν ο αριθμός των ζευγών των αναλύσεων (και επομένως των δειγμάτων), d_i η θετική ή αρνητική τιμή των διαφορών $x_{iA} - x_{iB}$, $\bar{d}$ ο μέσος όρος όλων των διαφορών d_i και s_d η τυπική απόκλιση μιας διαφοράς τιμών.

Πίνακας 3.1 : Τιμές του t ($t_{\text{θεωρητικό}}$) για διαφορετικές στάθμες εμπιστοσύνης.

Βαθμοί ελευθερίας ν	Στάθμη εμπιστοσύνης, %				
	80	90	95	99	99,9
1	3,08	6,31	12,7	63,7	637
2	1,89	2,92	4,30	9,92	31,6
3	1,64	2,35	3,18	5,84	12,9
4	1,53	2,13	2,78	4,60	8,60
5	1,48	2,02	2,57	4,03	6,86
6	1,44	1,94	2,45	3,71	5,96
7	1,42	1,90	2,36	3,50	5,40
8	1,40	1,86	2,31	3,36	5,04
9	1,38	1,83	2,26	3,25	4,78
10	1,37	1,81	2,23	3,17	4,59
11	1,36	1,80	2,20	3,11	4,44
12	1,36	1,78	2,18	3,06	4,32
13	1,35	1,77	2,16	3,01	4,22
14	1,34	1,76	2,14	2,98	4,14
∞	1,26	1,64	1,96	2,58	3,29

3.2.2. Δοκιμασία F (*F-test*)

Η δοκιμασία F χρησιμοποιείται για τη σύγκριση μιας νέας αναλυτικής μεθόδου, με μια άλλη αποδεκτή (πρότυπη) μέθοδο. Αυτή πραγματοποιείται με τον έλεγχο των διακυμάνσεων των πληθυσμιακών δειγμάτων των δυο μεθόδων. Ως F ορίζεται το πηλίκο των διακυμάνσεων των δυο μεθόδων (V), όπου η διακύμανση είναι το τετράγωνο της τυπικής απόκλισης (S^2) (εξίσωση 13) [294]:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} = \frac{V_A}{V_B} \quad (13)$$

όπου $S_1^2 > S_2^2$. Υπάρχουν δυο βαθμοί ελευθερίας, v_1 και v_2 που ορίζονται ως N_1-1 (ο αριθμός των μετρήσεων μείον ένα) και N_2-1 , αντίστοιχα. Όταν η τιμή του $F_{\text{πειραματικό}}$ (υπολογίζεται από την εξίσωση 13) είναι μεγαλύτερη της τιμής $F_{\text{θεωρητικό}}$ του Πίνακα 3.2 για την στάθμη εμπιστοσύνης που έχει επιλεχθεί, τότε υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο μεθοδολογιών. Είναι χαρακτηριστικό ότι για άπειρους βαθμούς ελευθερίας το $F_{\text{θεωρητικό}}$ είναι 1, για οποιαδήποτε στάθμη ελευθερίας. Στον Πίνακα 3.2 παρατίθενται οι τιμές του F για στάθμη εμπιστοσύνης 95% [294]:

Πίνακας 3.2: Τιμές του F για στάθμη εμπιστοσύνης 95%.

$V_1 \backslash V_2$	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20	30
2	19,0	19,2	19,2	19,3	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,5
3	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,70	8,66	8,02
4	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,86	5,86	5,75
5	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,62	4,56	4,50
6	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	3,94	3,87	3,81
7	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,51	3,44	3,38
8	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	3,22	3,15	3,08
9	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,01	2,94	2,86
10	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,85	2,77	2,70
15	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,40	2,33	2,25
20	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,20	2,12	2,04
30	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	2,01	1,93	1,84

3.3. Ανάλυση Διακύμανσης (Analysis Of Variance, ANOVA)

Όπως αναφέραμε και παραπάνω, το *t-test* χρησιμοποιείται για την σύγκριση δυο σειρών παρατηρήσεων, τι συμβαίνει όμως στην περίπτωση που θέλουμε να συγκρίνουμε περισσότερες από δυο; Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται η ανάλυση διακύμανσης (*analysis of variance, ANOVA*), παρέχοντας ένα περισσότερο αποτελεσματικό τρόπο αποτίμησης των διαφορών μεταξύ των πειραματικών δεδομένων. Η απλούστερη εφαρμογή της είναι η *ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA)*, όπου μελετάται η επίδραση ενός ελεγχόμενου παράγοντα. Για τις περιπτώσεις όπου εκτός του τυχαίου σφάλματος συνυπάρχουν δύο ή περισσότεροι παράγοντες που καθορίζουν τις τελικές πειραματικές τιμές χρησιμοποιείται η *ανάλυση διακύμανσης κατά δυο παράγοντες (two-way analysis of variance)*. Στην ANOVA, η συνολική διακύμανση διαχωρίζεται σε δυο συνιστώσες: στην διακύμανση *ανάμεσα στις ομάδες* (τυχαίο σφάλμα) και στην διακύμανση *μέσα στις ομάδες*.

3.3.1. Ανάλυση Διακύμανσης Ενόσ Παράγοντα (*One-Way ANOVA*)

Η απλούστερη περίπτωση εφαρμογής ANOVA είναι η σύγκριση k μέσων τιμών που προκύπτουν από k ομάδες μετρήσεων ή δειγμάτων, κάθε μία εκ των οποίων αποτελείται από n_j επιμέρους μετρήσεις (ο αριθμός μετρήσεων n_j μπορεί να είναι διαφορετικός σε κάθε ομάδα, δηλ. η 1η ομάδα (δείγμα) μπορεί να αποτελείται από 5 μετρήσεις, η 2η ομάδα από 3 μετρήσεις κ.λ.π.) όπως φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 3.3:

Πίνακας 3.3: Δεδομένα ανάλυσης διακύμανσης.

Μετρήσεις	Ομάδα			
	1	2	...	k
1	x_{11}	x_{12}	...	x_{1k}
2	x_{21}	x_{22}	...	x_{2k}
...	:	:	...	:
n_j	x_{nj1}	x_{nj2}	...	x_{njk}

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.3 υπολογίζονται οι παράμετροι που αφορούν κάθε ομάδα μετρήσεων και οι παράμετροι που αφορούν το σύνολο των μετρήσεων. Έτσι σύμφωνα με τα παραπάνω ισχύει:

1) Για κάθε ομάδα μετρήσεων υπολογίζονται:

 Το άθροισμα των μετρήσεων σύμφωνα με την εξίσωση 14:

$$A_j = \sum_{i=1}^{n_j} x_i \quad (14)$$

 Η μέση τιμή της ομάδας σύμφωνα με την εξίσωση 15:

$$\bar{x}_j = A_j / n_j \quad (15)$$

 Η διακύμανση της ομάδας σύμφωνα με την εξίσωση 16:

$$v_j = s_j^2 = \sum_{i=1}^{n_j} (\bar{x}_j - x_i)^2 / (n_j - 1) \quad (16)$$

👉 Το άθροισμα των τετραγώνων των υπολοίπων σύμφωνα με την εξίσωση 17:

$$\sum_{i=1}^{n_j} r_i^2 = \sum_{i=1}^{n_j} (\bar{x}_j - x_i)^2 = v_j(n_j - 1) \quad (17)$$

2) Για το σύνολο των μετρήσεων υπολογίζεται η εξίσωση 18:

$$\sum_{ij} (x_{ij} - \bar{x})^2 = \sum_{ij} (x_{ij} - \bar{x})^2 - n \sum_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2 \quad (18)$$

όπου ο όρος $\sum_{ij} (x_{ij} - \bar{x})^2$ είναι το ολικό άθροισμα των τετραγώνων SS που λαμβάνεται με άθροιση των τετραγώνων κάθε απόκλισης από τη μέση τιμή, ο όρος $(n \sum_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2)$ είναι το άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων ανάμεσα στις ομάδες SS_b , και ο όρος $\sum_{ij} (x_{ij} - \bar{x})^2$ είναι το άθροισμα των τετραγώνων μέσα στις ομάδες SS_w . Έτσι η εξίσωση 18 απλοποιείται στη εξίσωση 19:

$$SS = SS_w + SS_b \quad (19)$$

Στον Πίνακα 3.4 παρουσιάζονται συνοπτικά οι βασικές υπολογιζόμενες παράμετροι της ANOVA.

Πίνακας 3.4: Βασικές υπολογιζόμενες παράμετροι ANOVA για k τάξεις / δείγματα και n παρατηρήσεις.

Πηγή διακύμανσης	Άθροισμα τετραγώνων (SS)	Βαθμοί ελευθερίας	Διακύμανση	F
Ανάμεσα στις ομάδων	SS_b	$k-1$	$V_1 = SS_b/(k-1)$	$[SS_b/(k-1)] /$ $[SS_w/(N-k)]$
Μέσα στις ομάδες	SS_w	$N-k$	$V_2 = SS_w/(N-k)$	
Σύνολο	$SS = SS_b + SS_w$	$N-1$	$V = SS/(N-1)$	

Με τη βοήθεια της F-δοκιμασίας (εξίσωση 20) μπορεί να υπολογιστεί η σημαντικότητα μιας πηγής διακύμανσης, συγκρίνοντας την πειραματική τιμή του F ($F_{\text{πειραματικό}}$) με την θεωρητική τιμή ($F_{\text{θεωρητικό}}$) που προκύπτει από τον Πίνακα 3.2:

$$F = \frac{[SS_b/(k-1)]}{[SS_w/(N-k)]} \quad (20)$$

3.3.2. Ανάλυση Διακύμανσης Με Δυο Παράγοντες (*two-way ANOVA*)

Σε ένα πειραματικό σχεδιασμό δυο παραγόντων (*two-factor factorial design*) οι παράγοντες A και B που επηρεάζουν την εξαρτημένη μεταβλητή ελέγχονται αν έχουν επίδραση ο ένας επάνω στον άλλο. Με τη βοήθεια της Ανάλυσης Διακύμανσης δυο παραγόντων (*two-way ANOVA*) υπάρχει η δυνατότητα να εξακριβωθεί ποιος από τους δυο παράγοντες επιδρά σημαντικά στην ανεξάρτητη μεταβλητή και επίσης να γίνει έλεγχος αν οι δυο παράγοντες έχουν επίδραση ο ένας στον άλλο (*interaction*) ή είναι ανεξάρτητοι ο ένας από τον άλλο. Στην *two-way ANOVA*, το μοντέλο ελέγχου είναι περισσότερο περίπλοκο απ' ό,τι στην *one-way ANOVA* αλλά η διαδικασία ελέγχου είναι παρόμοια. Στον Πίνακα 3.5 παρουσιάζεται η ανάλυση διακύμανσης για δυο παράγοντες (*two-way ANOVA*) με αλληλεπίδραση ($A*B$).

Πίνακας 3.5: Ανάλυση διακύμανσης για δυο παράγοντες (two-way ANOVA) με αλληλεπίδραση A*B.

Διακύμανση	Άθροισμα τετραγώνων (SS)	Βαθμοί ελευθερίας (df)	Μέσα τετράγωνα (MS)
A' παράγοντας	SS_A	$a-1$	$SS_A/(a-1)$
B' παράγοντας	SS_B	$b-1$	$SS_B/(b-1)$
A*B αλληλεπίδραση	SS_{AB}	$(a-1)(b-1)$	$SS_{AB}/(a-1)(b-1)$
Σφάλμα	SS_E	$ab(n-1)$	$SS_E/ab(n-1)$
Σύνολο	SS_T	ab	

a = ο αριθμός των επιπέδων του παράγοντα A

b = ο αριθμός των επιπέδων του παράγοντα B

n = ο αριθμός των τιμών της εξαρτημένης μεταβλητής

SS_A = άθροισμα τετραγώνων αποκλίσεων μεταξύ των μέσων των ομάδων του παράγοντα A

SS_B = άθροισμα τετραγώνων αποκλίσεων μεταξύ των μέσων των ομάδων του παράγοντα B

SS_{AB} = άθροισμα τετραγώνων αποκλίσεων της αλληλεπίδρασης μεταξύ του παράγοντα A και B

3.4. Πειραματικός Σχεδιασμός

Για να δομηθεί σωστά ένας Πειραματικός Σχεδιασμός, θα πρέπει να επιλεγούν προσεκτικά οι παράγοντες και ο αριθμός των πειραμάτων που θα πρέπει να εκτελεστούν. Ο Πειραματικός Σχεδιασμός δεν είναι ένα μεμονωμένο σχέδιο. Αποτελείται από πολλούς παράγοντες που το επηρεάζουν, με θετικό ή αρνητικό τρόπο. Η διαδικασία επιλογής των πιο σημαντικών παραγόντων επιτυγχάνεται με τα αρχικά πειράματα (*screening design*) ενώ στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας, οι επιλεγμένοι παράγοντες βελτιστοποιούνται με τα Πειράματα Βελτιστοποίησης (*optimization experiments*) ώστε να επιτευχθούν οι καλύτερες δυνατές τιμές. Στο σχήμα 6 που παρουσιάζεται παρακάτω φαίνονται αναλυτικά οι διαδικασίες.



Σχήμα 6: Στάδια Πειραματικού Σχεδίου

3.5. Παραγοντικά Πειράματα (Factorial Experiment)

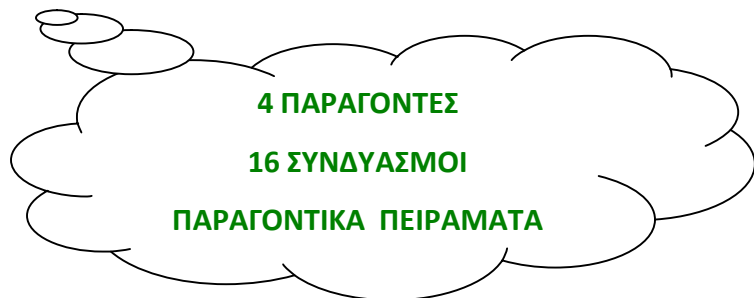
Ο παραδοσιακός τρόπος προσδιορισμού των βέλτιστων συνθηκών για ένα πολύπλοκο σύστημα περιλαμβάνει την αλλαγή των τιμών κάθε παράγοντα μεμονωμένα διατηρώντας τους υπόλοιπους σταθερούς (*one-factor at a time design*). Η μέθοδος αυτή έχει δυο βασικά μειονεκτήματα: 1) δεν λαμβάνονται υπόψη οι αλληλεπιδράσεις των παραγόντων, όταν αυτοί μεταβάλλονται συγχρόνως και 2)

πραγματοποιείται μεγάλος αριθμός πειραμάτων, καθιστώντας τη διαδικασία αρκετά χρονοβόρα και επίπονη για τον ερευνητή [295].

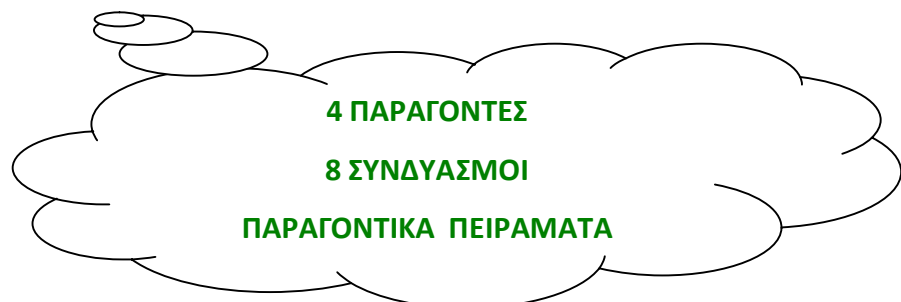
Τα τελευταία χρόνια για την μελέτη συστημάτων που περιλαμβάνουν πολλούς παράγοντες, ο Παραγοντικός Σχεδιασμός (Factorial Experimental design) είναι η καταλληλότερη επιλογή. Κεντρική ιδέα του Παραγοντικού Σχεδιασμού είναι ο έλεγχος των κύριων επιδράσεων των παραγόντων (*main effect*) καθώς και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων (*interaction*). Για παράδειγμα, αν υπάρχουν a επίπεδα του παράγοντα A και b επίπεδα του παράγοντα B, κάθε επανάληψη του πειράματος περιλαμβάνει ab συνδυασμούς.

Τα πειράματα αυτού του τύπου, χωρίζονται σε δυο κατηγορίες [295]:

- ☞ Στον πλήρως παραγοντικό σχεδιασμό (*full factorial design*), ο οποίος χρησιμοποιείται για μικρό αριθμό παραγόντων (4 ή 5) υπολογίζοντας τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις.



- ☞ Στον κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό (*fractional factorial design*), ο οποίος χρησιμοποιείται για μεγάλο αριθμό παραγόντων ενώ στόχος είναι να προσδιορισθούν οι σημαντικές μεταβλητές με μικρό αριθμό πειραμάτων.



3.6. Δυο επιπέδων σχεδιασμός (*two-level design*)

Ο περισσότερο διαδεδομένος παραγοντικός σχεδιασμός είναι ο σχεδιασμός δυο επιπέδων (*two-level design*), στον οποίο κάθε παράγοντας που εξετάζεται έχει μια μέγιστη «+1» και μια ελάχιστη «-1» τιμή. Οι Παραγοντικοί Πειραματικοί Σχεδιασμοί απεικονίζονται σε πίνακα με κωδικοποιημένες τιμές (+) ή (-) παρέχοντας ένα ομοιόμορφο πλαίσιο εργασίας, για την διερεύνηση των επιδράσεων των παραγόντων. Η εξίσωση 21 χρησιμοποιείται για τη μετατροπή των πραγματικών τιμών (z_i) στις κωδικοποιημένες (x_i) σύμφωνα με τον εκάστοτε πειραματικό σχεδιασμό:

$$x_i = \left(\frac{z_i - z_i^o}{\Delta z_i} \right) \beta_d \quad (21)$$

όπου Δz_i είναι η απόσταση μεταξύ της πραγματικής τιμής του κεντρικού σημείου (*central point*) και της πραγματικής τιμής της παραμέτρου στο ανώτερο ή κατώτερο επίπεδο, β_d είναι η κύρια κωδικοποιημένη τιμή κάθε παραμέτρου και z_o είναι η πραγματική τιμή στο κεντρικό σημείο [296].

3.6.1. Πλήρης Παραγοντικός Σχεδιασμός (*Full factorial design*)

Όπως αναφέραμε και παραπάνω, παρακλάδι του Παραγοντικού Σχεδιασμού είναι ο Πλήρης Παραγοντικός Σχεδιασμός. Ο σχεδιασμός αυτού του τύπου είναι ένας δυο επιπέδων πειραματικός σχεδιασμός και περιγράφεται ως 2^k . Ο αριθμός 2 υποδηλώνει τον αριθμό των επιπέδων των παραγόντων και ο εκθέτης k τον αριθμό των παραγόντων. Καθώς ο αριθμός των παραγόντων αυξάνεται, τότε ο αριθμός των πειραμάτων παρουσιάζει γεωμετρική αύξηση. Έτσι όταν έχουμε ένα πείραμα όπου εξετάζονται δυο παράγοντες ($k=2$) απαιτούνται 2^2 πειράματα ενώ όταν ο αριθμός των παραγόντων αυξηθεί στους τρεις ($k=3$) τότε τα πειράματα γίνονται 2^3 [295].

Ο 3^k παραγοντικός σχεδιασμός ελέγχει k παράγοντες, καθένα σε τρία επίπεδα. Τα επίπεδα των παραγόντων αναφέρονται σαν χαμηλό, μεσαίο και υψηλό και συμβολίζονται με τα ψηφία 0, 1 και 2, αντίστοιχα. Ο πιο απλός 3^k σχεδιασμός είναι ο 3^2 , ο οποίος ελέγχει δύο παράγοντες καθένα σε τρία επίπεδα.

3.6.2. Κλασματικός Παραγοντικός Σχεδιασμός (*fractional factorial design*)

Για μικρό αριθμό παραγόντων, ο Πλήρης Παραγοντικός Σχεδιασμός μπορεί να εφαρμοστεί ικανοποιητικά. Όταν ο αριθμός των παραγόντων αυξηθεί ($k > 5$), παρατηρείται γεωμετρική αύξηση του αριθμού των πειραμάτων (π.χ. για 7 παράγοντες ένα 2^7 σχέδιο πραγματοποιείται με 128 πειράματα) καθιστώντας δύσκολη τη διεκπεραίωση τους. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται ο Κλασματικός Παραγοντικός Σχεδιασμός, όπου ο αριθμός των πειραμάτων μειώνεται κατά ένα αριθμό p σύμφωνα με το 2^{k-p} σχέδιο [297]. Ο περισσότερο διαδεδομένος κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός που χρησιμοποιείται, είναι αυτός όπου τα πειράματα μειώνονται στο μισό ($p=1$). Τυπικό παράδειγμα αυτού του τύπου είναι ο Σχεδιασμός Αξιολόγησης Plackett-Burman.

Σχεδιασμός Αξιολόγησης Plackett-Burman

Πολλοί είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν μια πειραματική διαδικασία με θετικό ή αρνητικό τρόπο. Κρίνεται έτσι απαραίτητος ο έλεγχος και η επιλογή αυτών που την επηρεάζουν περισσότερο, εξοικονομώντας χρόνο αλλά και χρήμα. Η όλη διαδικασία επιλογής επιτυγχάνεται με τα πειράματα διαλογής ή εφαρμογή των οποίων: (1) βελτιώνει την ποιότητα της πειραματικής διαδικασίας προσδιορίζοντας το υψηλό ή το χαμηλό επίπεδο τιμών μιας συγκεκριμένης παραμέτρου, (2) ελαχιστοποιεί τον αριθμό των πειραμάτων ενώ ταυτόχρονα μεγιστοποιεί την λαμβανόμενη πληροφορία και (3) τα αποτελέσματα μπορούν να ελεγχθούν αποτελεσματικά μέσω μιας μαθηματικής εξίσωσης [298].

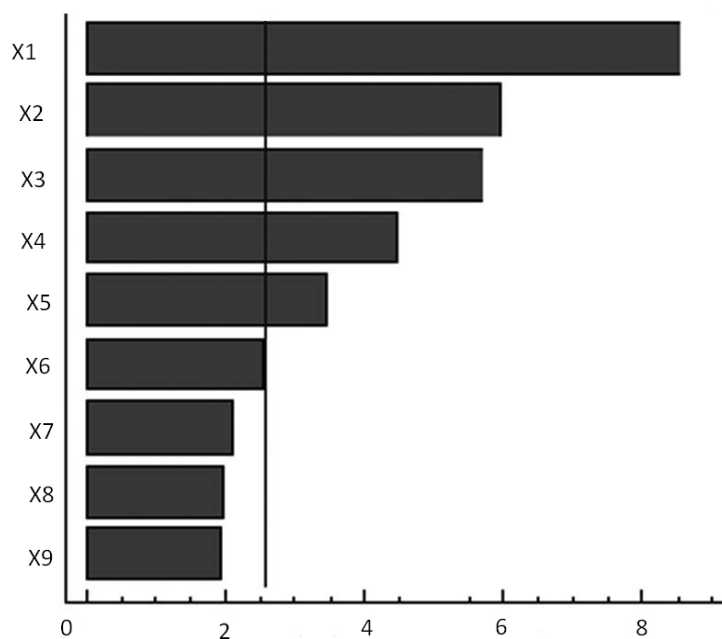
Ο περισσότερος διαδεδομένος σχεδιασμός αξιολόγησης είναι ο σχεδιασμός Plackett-Burman ο οποίος αναπτύχθηκε το 1946 από τους R.L. Plackett και J.P. Burman [299]. Είναι ένας δυο επιπέδων κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός, ο οποίος αποσκοπεί στην βελτίωση της ποιότητας της πειραματικής διαδικασίας. Σχεδιασμοί αυτού του τύπου μπορούν να ελέγξουν περισσότερους από $n-1$ παράγοντες (όπου $n-1 \geq 7$) σε ένα πειραματικό σχεδιασμό με n πειράματα, με τον κάθε ένα παράγοντα να εξετάζεται σε δυο επίπεδα: (-1) το χαμηλό και (+1) το υψηλό. Στην περίπτωση όπου ο συνολικός αριθμός των μεταβλητών είναι μικρότερος από επτά, ο πειραματικός σχεδιασμός συμπληρώνεται χρησιμοποιώντας τις λεγόμενες ψευτομεταβλητές (*dummy*). Η χρήση τους στοχεύει στην εκτίμηση του πειραματικού σφάλματος και στον έλεγχο την ορθότητας του προτεινόμενου μαθηματικού μοντέλου [300]. Κύριο χαρακτηριστικό του σχεδιασμού αξιολόγησης Plackett-Burman είναι ότι ο συνολικός αριθμός των πειραμάτων είναι πολλαπλάσιο του τέσσερα και όχι δύναμη του δυο ($4k$ παρατηρήσεις με $k = 1, 2 \dots n$). Τα βήματα που ακολουθούνται σε πειράματα αυτού του τύπου είναι τα ακόλουθα [298]:

- ✓ Επιλογή των παραγόντων
- ✓ Καθορισμός των επιπέδων κάθε παράγοντα
- ✓ Επιλογή της προσδιοριζόμενης απόκρισης
- ✓ Δημιουργία του πειραματικού σχεδιασμού
- ✓ Εκτέλεση των πειραμάτων
- ✓ Επανάληψη των πειραμάτων
- ✓ Ανάπτυξη του μαθηματικού μοντέλου
- ✓ Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων και γραφική απεικόνιση
- ✓ Ερμηνεία και συμπεράσματα που εξάγονται από την στατιστική ανάλυση
- ✓ Προτεινόμενες βελτιώσεις και αν κρίνεται απαραίτητο εφαρμογή σχεδιασμών υψηλότερης ανάλυσης.

Μετά τη συλλογή των δεδομένων αυτά ερμηνεύονται με μια πρώτου βαθμού πολυωνυμική εξίσωση (εξίσωση 22):

$$y = \beta_o + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i \quad (22)$$

όπου y είναι η απόκριση, β_o και β_i είναι οι συντελεστές γραμμικότητας και x_i είναι η κωδικοποιημένη τιμή του παράγοντα [301]. Στη συνέχεια βασιζόμενοι στην ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και το διάγραμμα Pareto (Pareto-chart) για το εκτιμώμενο μοντέλο, προσδιορίζονται οι παράγοντες που επηρεάζουν το σύστημα. Στο σχήμα 7 οι παράγοντες ταξινομούνται κατά φθίνουσα σειρά ($X_1, X_2, \dots$) ενώ η σημαντικότητα του καθενός απεικονίζεται με μια οριζόντια στήλη. Τέλος, μια κάθετη γραμμή που αντιστοιχεί στο 95% διάστημα εμπιστοσύνης ορίζει την σημασία του κάθε παράγοντα [298].



Σχήμα 7: Απεικόνιση του διαγράμματος Pareto.

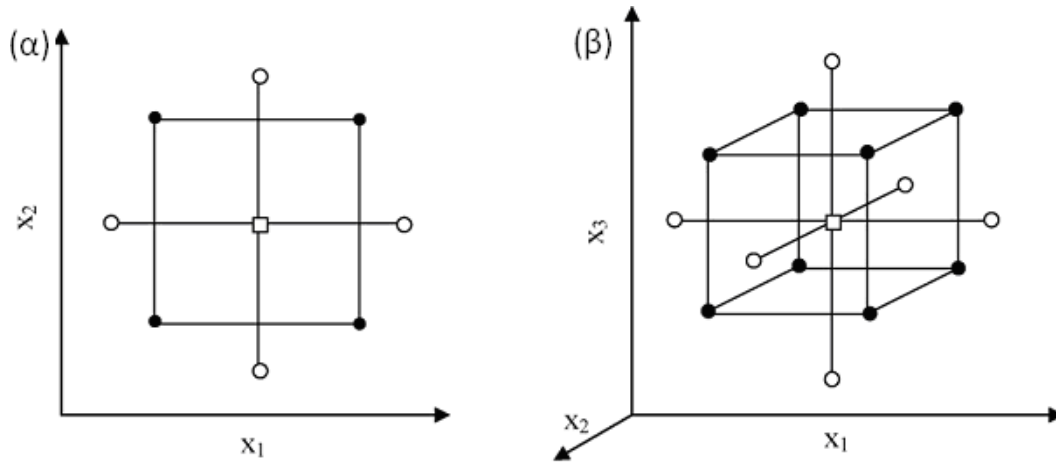
3.7. Μέθοδος Απόκρισης Επιφάνειας

Η μεθοδολογία των αποκριτικών επιφανείων αναπτύχθηκε από τους Box και Wilson το 1951 και Box και Youle το 1955 και επαναδιατυπώθηκε από τον Box (1999) [302]. Είναι μια συλλογή μαθηματικών και στατιστικών τεχνικών για την ανάπτυξη, βελτίωση και βελτιστοποίηση διαδικασιών. Η διαδικασία αυτή είναι χρήσιμη για την ανάλυση προβλημάτων στα οποία μια απόκριση ενδιαφέροντος επηρεάζεται από αρκετές μεταβλητές και σκοπός είναι η βελτιστοποίηση της απόκρισης. Με τον όρο απόκριση εννοούμε τη μετρούμενη ποσότητα, η τιμή της οποίας επηρεάζεται από τις αλλαγές των επιπέδων των παραγόντων.

3.7.1. Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)

Ο Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD) εφαρμόστηκε πρώτη φορά το 1951 από τους Box και Wilson [302]. Αποτελείται από [296]: i) Το παραγοντικό τμήμα του σχεδιασμού δηλαδή έναν πλήρη παραγοντικό σχεδιασμό, όπου τα επίπεδα των παραγόντων είναι κωδικοποιημένα στις τιμές -1, +1, ii) τα κεντρικά σημεία (*central points*) ($C_p > 1$) που μας δίνουν τη δυνατότητα να εκτιμήσουμε το πειραματικό σφάλμα καθώς και την ύπαρξη καμπυλότητας και iii) το αξονικό τμήμα του σχεδιασμού δηλαδή δύο αξονικά σημεία (*star points*) στον άξονα κάθε μεταβλητής του σχεδιασμού σε απόσταση α από το κέντρο του σχεδιασμού. Οι τιμές α (αξονικά σημεία) εξαρτώνται από τον αριθμό των μεταβλητών και υπολογίζονται από τον τύπο $\alpha = 2^{k/4}$. Για δυο, τρεις ή τέσσερις μεταβλητές ο αριθμός « α » είναι 1.41, 1.68 και 2.00, αντίστοιχα. Καταλήγοντας, ο πειραματικός σχεδιασμός αποτελείται από F (2^k) παραγοντικά σημεία, $2k$ αξονικά σημεία και c_p κεντρικά σημεία. Ο αριθμός των πειραμάτων καθορίζεται από την σχέση $N = 2^k + 2k + c_p$, όπου k είναι ο αριθμός των μεταβλητών. Τέλος, όλες οι μεταβλητές μελετώνται σε πέντε επίπεδα (- α , -1, 0, +1, + α).

Στο σχήμα 8 απεικονίζεται ο Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός για την βελτιστοποίηση δυο (8α) και τριών (8β) μεταβλητών.



Σχήμα 8: Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός για την βελτιστοποίηση: (α) δυο και (β) τριών μεταβλητών, όπου (•) τα σημεία του παραγοντικού σχεδιασμού, (ο) τα αξονικά σημεία (star points), (□) τα κεντρικά σημεία (central points)

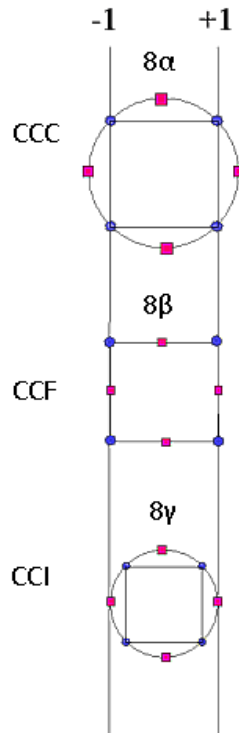
Στον Πίνακα 3.6 παρουσιάζονται οι κωδικοποιημένες τιμές του σχεδιασμού για δυο (α) και τρεις (β) μεταβλητές.

Πίνακας 3.6: Κωδικοποιημένες τιμές για τον CCD σχεδιασμό α) για δυο και β) για τρεις μεταβλητές.

(α)			(β)			
2 Μεταβλητές	x_1	x_2	3 Μεταβλητές	x_1	x_2	x_3
Σημεία παραγοντικού σχεδιασμού	-1 1 -1 1	-1 -1 1 1	Σημεία παραγοντικού σχεδιασμού	-1	-1	-1
				1	-1	-1
				-1	1	-1
				1	1	-1
				-1	-1	1
				1	-1	1
Αξονικά σημεία	-α α 0 0	0 0 -α α	Αξονικά σημεία	-1	1	1
				1	1	1
				-α	0	0
				α	0	0
				0	-α	0
				0	α	0
Κεντρικά σημεία	0	0	Κεντρικά σημεία	0	0	-α
				0	0	α
Κεντρικά σημεία	0	0	Κεντρικά σημεία	0	0	0
				0	0	0

Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι για τον Κεντρικό Σύνθετο Σχεδιασμό, που εξαρτώνται από το που τοποθετούνται τα αξονικά σημεία. Διαχωρίζονται στον *Κυκλικό Κεντρικό Σχεδιασμό (Circumscribed Central Design, CCC)*, στον *Εγγεγραμμένο Κεντρικό Σχεδιασμό (Inscribed Central design, CCI)* και στον *Κεντρικό Σύνθετο Σχεδιασμό Κεντρικής Διευθέτησης (Central Composite Face-Centred Design, CCF)*. Στο CCC σχεδιασμό, τα αξονικά σημεία βρίσκονται σε απόσταση α από το κέντρο του κύβου ενώ σχεδιασμοί αυτού του τύπου έχουν κυκλική ή σφαιρική συμμετρία και χρειάζονται πέντε επίπεδα για κάθε παράγοντα (σχήμα 9α). Στο CCI σχεδιασμό, τα σημεία του παραγοντικού σχεδιασμού τοποθετούνται στο εσωτερικό του κύβου

έχοντας κυκλική ή σφαιρική συμμετρία, απαιτώντας πέντε επίπεδα για κάθε παράγοντα (σχήμα 9γ). Τέλος, στο CCF σχεδιασμό, τα αξονικά σημεία τοποθετούνται στο μισό της απόστασης ανάμεσα στα σημεία του παραγοντικού σχεδιασμού ενώ απαιτούνται τρία επίπεδα για κάθε παράγοντα (σχήμα 9β) [303].



Σχήμα 9: Σχηματική απεικόνιση των α) CCC, β) CCF και γ) CCI σχεδιασμών.

3.7.2. Μαθηματικό Μοντέλο

Μετά την επιλογή του κατάλληλου πειραματικού σχεδιασμού και την κωδικοποίηση των τιμών του, κρίνεται απαραίτητη η περιγραφή των παρατηρούμενων αποκρίσεων. Αυτό επιτυγχάνεται με την εφαρμογή της κατάλληλης μαθηματικής εξίσωσης. Συνεπώς, όταν δεν παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων και οι αποκρίσεις δεν παρουσιάζουν καμπυλότητα, χρησιμοποιείται μια πρώτου βαθμού εξίσωση (α' βαθμού μοντέλο) (εξίσωση 23):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \varepsilon \quad (23)$$

όπου Y είναι η παρατητούμενη αποκριτική μεταβλητή, β_o , β_i οι συντελεστές των πρωτοβάθμιων παραμέτρων, x_i αντιπροσωπεύει τις μεταβλητές και ε το σφάλμα [296].

Στην αντίθετη περίπτωση, όπου παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων, χρησιμοποιείται ένας δυο επιπέδων παραγοντικός σχεδιασμός με ένα κεντρικό σημείο ώστε να εκτιμηθεί η καμπυλότητα. Συνεπώς, εφαρμόζεται μια δεύτερου βαθμού (β' βαθμού μοντέλο) πολυωνυμική εξίσωση (εξίσωση 24):

$$Y = \beta_o + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (24)$$

όπου β_{ij} ο συντελεστής των παραμέτρων x_i , x_j που αλληλεπιδρούν [296]. Τέλος, ο προσδιορισμός των κρίσιμων σημείων (μέγιστο, ελάχιστο) πραγματοποιείται με την εφαρμογή της παρακάτω πολυωνυμικής εξίσωσης (εξίσωση 25):

$$y = \beta_o + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (25)$$

όπου β_{ij} ο συντελεστής των δευτεροβάθμιων παραμέτρων. Για να υπολογιστούν οι παράγοντες της εξίσωσης 25, κρίνεται απαραίτητο όλες οι μεταβλητές να μελετώνται σε τρία επίπεδα [296].

3.7.3. Βελτιστοποίηση Πολλαπλών Αποκρίσεων - Μέθοδος Της Επιθυμητής Συνάρτησης (*Desirability Function, D*)

Συνήθως, τα περισσότερα πειράματα που πραγματοποιούνται περιλαμβάνουν την βελτιστοποίηση δύο ή περισσότερων μεταβλητών, με την αύξηση ή μείωση των τιμών των αποκρίσεων. Η διεργασία αυτή είναι ιδιαίτερα ανταγωνιστική, καθώς στην προσπάθεια να βελτιωθεί η απόκριση της μιας μεταβλητής χειροτερεύει της άλλης. Ένας τρόπος για να επιλυθεί το πρόβλημα της

βελτιστοποίησης των πολλαπλών αποκρίσεων είναι με τη βοήθεια της μεθόδου της επιθυμητής συνάρτησης (*desirability function, D*).

Η μέθοδος της επιθυμητής συνάρτησης αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Harrington [304] ενώ στη συνέχεια τροποποιήθηκε από τους Derringer και Suich [306]. Η γενική αρχή της μεθόδου προϋποθέτει την μετατροπή της απόκρισης (y_i) σε μια ατομική επιθυμητή συνάρτηση (d_i) η τιμή της οποίας είναι 0 (ως η λιγότερο επιθυμητή τιμή της απόκρισης) και 1 (ως η περισσότερη επιθυμητή τιμή της απόκρισης).

Αν θέλουμε την μέγιστη τιμή της απόκρισης (y_i) τότε:

Μέγιστη

$d_i = 0$ εάν $y_i <$ από την ελάχιστη τιμή

$0 \leq d_i \leq 1$ εάν το y_i κυμαίνεται από το ελάχιστο στο μέγιστο

$d_i = 1$ εάν το $y_i >$ από την μέγιστη τιμή

Αν θέλουμε την ελάχιστη τιμή της απόκρισης (y_i) τότε:

Ελάχιστη

$d_i = 1$ εάν $y_i <$ από την ελάχιστη τιμή

$1 \geq d_i \geq 0$ εάν το y_i κυμαίνεται από το ελάχιστο στο μέγιστο

$d_i = 0$ εάν το $y_i >$ από την μέγιστη τιμή

Υπάρχουν όμως φορές που η τιμή της απόκρισης δεν θέλουμε να είναι ούτε μέγιστη ούτε ελάχιστη αλλά στοχευόμενη τότε:

Στοχευόμενη

$d_i = 0$ εάν $y_i <$ από την ελάχιστη τιμή

$0 \leq d_i \leq 1$ εάν το y_i κυμαίνεται από το ελάχιστο στον στόχο.

$1 \geq d_i \geq 0$ εάν το y_i κυμαίνεται από τον στόχο στο μέγιστο.

$d_i = 0$ εάν το $y_i >$ από την μέγιστη τιμή.

Στη συνέχεια το σύνολο των ατομικών επιθυμητών συναρτήσεων ($d_1, d_2, d_3 \dots$) συνοψίζονται σε μια ολική επιθυμητή συνάρτηση (D) όπως παρουσιάζεται στην εξίσωση 26:

$$D = (d_1 \times d_2 \times d_3 \cdots \times d_n)^{1/n} = \left(\prod_{i=1}^n d_i \right)^{1/n} \quad (26)$$

όπου n ο αριθμός των αποκρίσεων σε μια μέτρηση. Η ταυτόχρονη βελτιστοποίηση των αποκρίσεων προϋποθέτει την ύπαρξη μιας μέγιστης και μιας ελάχιστης τιμής. Αξίζει να αναφέρουμε ότι η εφαρμογή της μεθόδου των επιθυμητών συναρτήσεων στην Αναλυτική Χημεία προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα. Είναι μια οικονομική πρόταση, ιδιαίτερα αποτελεσματική παρέχοντας αντικειμενικότητα στην διαδικασία βελτιστοποίησης των πολλαπλών αποκρίσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Μέχρι σήμερα οι παραδοσιακές αναλυτικές μέθοδοι χαρακτηρίζονται για το υψηλό κόστος και τους μεγάλους όγκους τοξικών οργανικών διαλυτών που απαιτούνται. Η διαπίστωση αυτή έμελλε να αποτελέσει και το εφαλτήριο για την ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθόδων, υψηλής ευαισθησίας, ταχείας εφαρμογής και φυσικά φιλικών προς το περιβάλλον. Αυτοί ήταν και οι λόγοι για τους οποίους στην παρούσα Διατριβή επιλέχθηκαν να μελετηθούν λεπτομερώς δυο νέες αναλυτικές μέθοδοι, η **υγρή υγρή μικροεκχύλιση διασποράς (DLLME)** και η **υγρή υγρή μικροεκχύλιση διασποράς βασιζόμενη στην στερεοποίηση της επιπλέουσας οργανικής φάσης (DLLME-SFO)**.

Οι αναλυτικές μέθοδοι, **DLLME** και **DLLME-SFO**, εφαρμόστηκαν σε μίγματα αναλυτών της κατηγορίας των Προϊόντων Προσωπικής Περιποίησης, Αντιηλιακών Παραγόντων (φίλτρα UV), Πολυκυκλικών αρωματικών ενώσεων (PCMs) και φθαλικών εστέρων (PAEs). Η επιλογή των αναλυτών Celestolide (ADBI), Galaxolide (HHCB), Tonalide (AHTN), Phantolide (AHMI), Traseolide (ATII), Benzyl butyl phthalate (BBP), Di-*n*-octyl phthalate (DOP) Eusolex 4360, Eusolex 6300, Eusolex 9020, Octyl salicylate, Eusolex Homosalate και Eusolex 6007 (OD-PABA) έγινε με κύριο γνώμονα την **ευρεία χρήση** τους από την βιομηχανία των καλλυντικών (σαμπουάν, αφρόλουτρα, αρώματα) και τον άνθρωπο, την **ύπαρξή τους στο περιβάλλον** και τέλος τον χαρακτηρισμό τους ως **αναδυσόμενοι ρύποι**.

Κάθε μια αναλυτική μέθοδος, **DLLME** και **DLLME-SFO**, μελετήθηκε ξεχωριστά για κάθε μίγμα αναλυτών (φίλτρα UV και PCMs/PAEs), σε επιφανειακά ύδατα και στερεά υποστρώματα (εδάφη) στοχεύοντας σε υψηλές τιμές ανακτήσεων και χαμηλά όρια ανίχνευσης. Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματογράφο μάζας (GC-MS) και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας (HPLC/UV-DAD). Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων κάθε μιας αναλυτικής μεθόδου επετεύχθη με τη βοήθεια **χημειομετρικών μεθόδων**.

Επόμενος στόχος ήταν η στατιστική συγκριτική μελέτη των δυο αναλυτικών μεθόδων, **DLLME** και **DLLME-SFO**, χρησιμοποιώντας την δοκιμασία F (*F-test*) και την δοκιμασία t (*t-test*).

Οι χαμηλής τοξικότητας διαλύτες εκχύλισης, η εύκολη και χωρίς απώλειες απομάκρυνση τους από τα υδατικά διαλύματα, ήταν τα βασικά πλεονεκτήματα της **DLLME-SFO** έναντι της **DLLME**, ώστε να επιλεγεί για το επόμενο στάδιο της Διατριβής. Η επιλεγμένη μέθοδος αφού βελτιστοποιήθηκε και επικυρώθηκε, εφαρμόστηκε σε πραγματικά δείγματα, επιφανειακά ύδατα και υγρά απόνερα από τις Μονάδες Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων της πόλης των Ιωαννίνων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.1. Υλικά

5.1.1. Αντιδραστήρια Και Διαλύτες

Οι **PCMs**: 4-acetyl-1,1-dimethyl-6-tert-butylindan (celestolide, ADBI), 1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta[γ]-2-benzopyran (galaxolide, HHCB), 7-acetyl-1,1,3,4,4,6-hexa-carmethyltetralin (tonalide, AHTN), 6-acetyl-1,1,2,3,3,5-hexamethylindan (phantolide, AHMI), 5-acetyl-1,1,2,6-tetramethyl-3-isopropylindan (traseolide, ATII) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν του οίκου LGC Promochem Iberia (Wesel, Germany).

Οι **PAEs**: benzyl butyl phthalate (BBP, >98%) και di-*n*-octyl phthalate (DnOP, >98%) ήταν των οίκων E. Merck (Darmstadt, Germany) και Fluka (Denmark, Germany), αντίστοιχα.

Τα **φίλτρα UV**: 2-hydroxyl-4-methoxybenzophenone (Eusolex 4360), 3-(4-methylbenzylidene)-camphor (Eusolex 6300), 1-(4-tert-butylphenyl)3-(4-methoxyphenyl)1,3-propanedione (Eusolex 9020), 2-ethylhexylsalicylate (Octylsalicylate), salicylic acid 3,3,5-trimethylcyclohexyl ester (Eusolex Homosalate, HMS) και octyl dimethyl para-aminobenzoate (Eusolex 6007, OD-PABA) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν του οίκου E. Merck (Darmstadt, Germany).

Το εσωτερικό πρότυπο Hexamethylbenzene, οι οργανικοί διαλύτες ακετόνη, μεθανόλη, αιθανόλη, χλωροφόρμιο, καθώς και το χλωριούχο νάτριο (NaCl, καθαρότητας > 99.5%) ήταν του οίκου E. Merck (Darmstadt, Germany). Οι διαλύτες τετραχλωροαιθυλένιο, τετραχλωράνθρακας, 1-εντεκανόλη (1-UD-OH), 1-δωδεκανόλη (1-DD-OH), 2-δωδεκανόλη (2-DD-OH), *n*-εξαδεκάνιο (*n*-HD) προμηθεύτηκαν από την Sigma–Aldrich (Denmark, Germany).

5.1.2. Επιλογή Πρότυπων Ουσιών Και Διαλύματα Αυτών

Στην παρούσα διατριβή η επιλογή των ουσιών έγινε με κύριο γνώμονα την ευρεία χρήση τους από την βιομηχανία των καλλυντικών και τον άνθρωπο, την ύπαρξη τους στο περιβάλλον καθώς και τον χαρακτηρισμό τους ως «αναδυόμενους

ρύπους». Στο Κεφάλαιο 1 έχουμε αναφερθεί αναλυτικά στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των επιλεγμένων ουσιών.

Τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης (stock) των PCMs και των PAEs παρασκευάστηκαν σε διαλύτη ακετόνη ενώ των φίλτρων UV και του εσωτερικού προτύπου σε διαλύτη μεθανόλη. Τα διαλύματα φυλάχτηκαν στους 4° C σε γυάλινες ογκομετρικές φιάλες των 10 mL. Τα πρότυπα διαλύματα εργασίας των προς ανάλυση ουσιών, του εσωτερικού προτύπου καθώς και των μιγμάτων τους παρασκευάστηκαν με τις κατάλληλες αραιώσεις σε διάφορες συγκεντρώσεις.

5.2. Αναλυτικά Όργανα Και Σκεύη

Κατά τη διάρκεια των πειραματικών αναλύσεων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα και συσκευές:

- ☞ Αέριος Χρωματογράφος συζευγμένος με φασματογράφο μάζας (GC-MS) της *Simadzu*, με ανιχνευτή μάζας QP 5000 και τριχοειδή στήλη DB-5MS (J & W, Folsom, CA, USA).
- ☞ Υγρός Χρωματογράφος υψηλής απόδοσης συζευγμένος με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας (HPLC-UV/DAD), της *Shimadzu* (*Kyoto, Japan*) μοντέλο αντλίας LC – 10ADVP σε σύνδεση με 6 – θυρών βαλβίδα μοντέλου 7725i *Rheodyne*.
- ☞ Πεχάμετρο (pH-meter), μοντέλο 701A της *Orion Research*.
- ☞ Γυάλινες μικροσύριγγες των 5 μ L και 50 μ L και σύριγγα των 5 mL, *Hamilton*.
- ☞ Συσκευή υπερήχων, *Fritsch GMBH laborette 17, Germany*, 40 kHz.

5.2.1. Αέριος Χρωματογράφος Συζευγμένος με Φασματογράφο Μάζας (GC-MS)

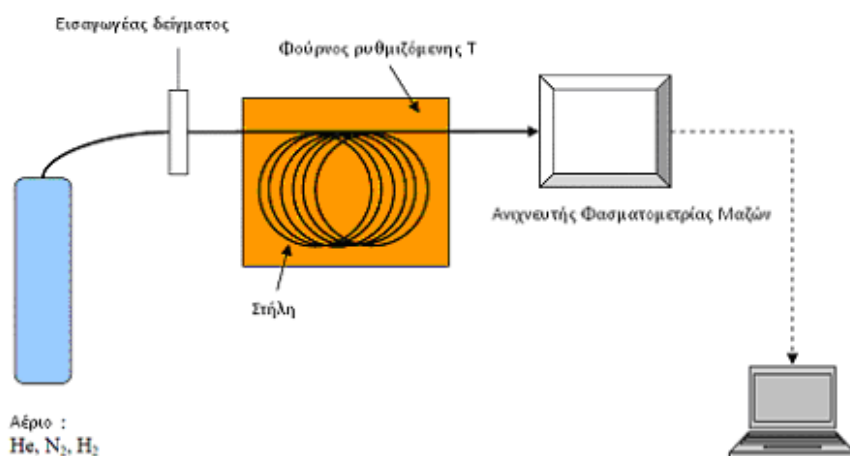
Η τεχνική της Αέριας Χρωματογραφίας συζευγμένη με Φασματογράφο Μάζας (GC-MS) επιτρέπει την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό των επιμέρους συστατικών πολύπλοκων μιγμάτων. Η τεχνική GC-MS, συνδυάζει τα χαρακτηριστικά της Αέριας Χρωματογραφίας και της Φασματομετρίας Μάζας. Κάθε σύστημα GC-MS αποτελείται από δύο κύρια μέρη: τη μονάδα αέριας χρωματογραφίας και τη μονάδα φασματόμετρου μαζών.

Η *αέρια χρωματογραφία (GC)* είναι μια τεχνική χρωματογραφικού διαχωρισμού των πτητικών συστατικών ενός δείγματος. Ο διαχωρισμός κάθε επιμέρους πτητικού συστατικού επιτυγχάνεται λόγω των διαφόρων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών του μίγματος, του υλικού πληρώσεως και κάλυψης της στήλης και τη ροή του φέροντος αερίου [306]. Τα σχηματιζόμενα ιόντα χαρακτηρίζονται από το λόγο m / z , όπου m είναι η μάζα και z το φορτίο. Ο συνδυασμός της αέριας χρωματογραφίας με την φασματομετρία μάζας επιτρέπει την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό των επιμέρους συστατικών πολύπλοκων μιγμάτων ακόμα και όταν αυτά βρίσκονται σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Τα συστήματα χρωματογραφίας λειτουργούν με τη βοήθεια δύο φάσεων, την σταθερή και την κινητή. Εάν η κινητή φάση είναι υγρή, η τεχνική ονομάζεται υγρή χρωματογραφία (LC) ενώ αν είναι αέρια, ονομάζεται αέρια χρωματογραφία (GC). Η τυπική αέρια φάση των συστημάτων αέριας χρωματογραφίας είναι το He.

Η *αρχή λειτουργίας* του GC-MS έχει ως εξής:

Αρχικά το δείγμα με την χρήση ύδατος ή οργανικών διαλυτών αποσπάται από το φυσικό του υπόστρωμα, συμπυκνώνεται (σε μL) και εισάγεται στη χρωματογραφική στήλη. Τα μόρια των χημικών ενώσεων διαχωρίζονται εντός της χρωματογραφικής στήλης και εισέρχονται στο φασματόμετρο μάζας. Το φασματόμετρο μάζας αποτελείται από την πηγή ιόντων, ένα μαγνήτη και ένα σύστημα συλλογής ιόντων. Στην πηγή ιόντων τα αέρια μόρια βομβαρδίζονται με ηλεκτρόνια (ion source) παράγοντας θραύσματα ιόντων. Αυτά διερχόμενα από το μαγνητικό πεδίο,

εκτρέπονται, με την τροχιά τους να εξαρτάται από την ιοντική μάζα, την τάση στην πηγή ιόντων και το ιοντικό φορτίο. Το παραγόμενο φάσμα κάθε ιοντικού θραύσματος είναι χαρακτηριστικό του αρχικού μορίου της ένωσης από όπου προήλθε κάνοντας δυνατό τον προσδιορισμό του. Στην εικόνα 10 παρουσιάζεται η σχηματική διάταξη ενός οργάνου GC-MS.



Εικόνα 10: Σχηματική διάταξη του οργάνου GC-MS

Η ανάλυση των PCMs, PAEs και των φίλτρων UV πραγματοποιήθηκε σε GC-MS της Simadzu, με ανιχνευτή μάζας QP 5000 και τριχοειδή στήλη DB-5MS (J & W, Folsom, CA, USA) με μήκος 30 m, εσωτερική διάμετρο 0.32mm και πάχος φιλμ 0.25mm. Η στήλη ήταν επικαλυμμένη με υλικό 5% biphenyl–95% dimethylsiloxane ενώ ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο (He). Για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανίχνευσης των επιλεγμένων ιόντων (Selective Ion Monitoring, SIM). Η επιλογή των ιόντων έγινε με γνώμονα τα δομικά χαρακτηριστικά της κάθε ένωσης, τη σχετική ένταση των ιόντων και την απουσία παρεμφερών ιόντων άλλης ένωσης στην ίδια περιοχή. Οι χρωματογραφικές συνθήκες ποικίλουν για κάθε κατηγορία πειραμάτων και γι' αυτό το λόγο οι συνθήκες, οι χρόνοι κατακράτησης και τα επιλεγμένα ιόντα αναφέρονται αναλυτικά σε κάθε κεφάλαιο.

5.2.2. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Συζευγμένη Με Ανιχνευτή Υπεριώδους Ακτινοβολίας (HPLC-UV/DAD)

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) χρησιμοποιείται ως μέθοδος διαχωρισμού και ταυτοποίησης οργανικών ενώσεων. Η στατική φάση, αποτελείται από οξείδιο πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες (π.χ. αλκύλια, φαινύλιο, αμινομάδες, κυανομάδες κ.ά) ή πολυμερείς ενώσεις, ενώ η κινητή από αδρανείς διαλύτες (π.χ. νερό, οργανικοί διαλύτες και ρυθμιστικά διαλύματα). Η διάταξη HPLC αποτελείται από: 1) τις φιάλες των υγρών διαλυτών (κινητή φάση), 2) το θάλαμο εισαγωγής του δείγματος (injector), 3) την στήλη ανάλυσης του δείγματος (analytical column), 4) τις αντλίες πίεσης (pumps) για τη ροή των διαλυτών, με τη βαλβίδα ανάμιξης και προγραμματισμού ροής αυτών, 5) τον ανιχνευτή (detector) και 6) το σύστημα επεξεργασίας των δεδομένων. Στην HPLC, η βασική αρχή μεθόδου στηρίζεται στο διαχωρισμό των συστατικών καθώς αυτά διέρχονται από τη στατική φάση της στήλης, με τη βοήθεια της κινητής φάσης που αποτελείται από διαλύτες κατάλληλης πολικότητας για τον διαχωρισμό. Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας τον χρόνο έκλουσης της κάθε ουσίας, με αυτό των προτύπων διαλυμάτων των ουσιών σε όμοιες χρωματογραφικές συνθήκες.

Η ανάλυση των επιλεγμένων φίλτρων UV πραγματοποιήθηκε σε υγρό χρωματογράφο της Simadzu με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας με διάταξη συστοιχίας διόδων λυχνιών SPD-M10A (UV/Diode Array Detector, UV/DAD). Το όργανο της HPLC περιλαμβάνει αντλία LC-10AD, σύστημα απαέρωσης της κινητής φάσης DGU-14A και σύστημα μίξης των διαλυτών FCV-10AL. Τα φίλτρα UV διαχωρίστηκαν σε αναλυτική στήλη Discovery C18 (25 cm μήκος x 4.6 mm εσωτερική διάμετρος: 5 μ m μέγεθος σωματιδίων) της Supelco (Bellefonte, PA, USA) προσαρμοσμένη με προστήλη Supelguard Discovery C18 της ίδιας σύστασης (2 cm x 4.0 mm, 5 μ m).

5.2.3. Χρωματογραφικός Διαχωρισμός Και Ποσοτικοποίηση

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των χημικών στοιχείων και ενώσεων που έχουν προκύψει είναι ο κύριος στόχος της χημικής ανάλυσης. Για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο GC-MS (SIM μέθοδος), η ταυτοποίηση των ουσιών πραγματοποιήθηκε με βάση τον χρόνο κατακράτησης τους (με απόκλιση της τάξης του 1% σε σχέση με τον χρόνο κατακράτησης των πρότυπων ουσιών) καθώς και τα επιλεγμένα ιόντα της κάθε ουσίας. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους: 1) με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου και 2) με τις πρότυπες καμπύλες αναφοράς. Στην περίπτωση που ως μέθοδος ποσοτικοποίησης χρησιμοποιήθηκε το εσωτερικό πρότυπο, οι ουσίες προσδιορίστηκαν σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση 27:

$$RRF_{(A)} = \frac{Area_{(IS)} / C_{(IS)}}{Area_{(A)} / C_{(A)}} \quad (27)$$

όπου $RRF_{(A)}$ ο συντελεστής σχετικής απόκρισης για την ένωση A, $C_{(A)}$ η συγκέντρωση της ένωσης A στο δείγμα, $C_{(IS)}$ η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου στο δείγμα, $Area_{(A)}$ το εμβαδόν της κορυφής της ένωσης A και $Area_{(IS)}$ το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου.

Στην δεύτερη περίπτωση, της καμπύλης αναφοράς, η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τα εμβαδά των κορυφών των αντίστοιχων ενώσεων. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν δυο φορές για κάθε σημείο προτού κατασκευαστεί το γράφημα της κάθε ουσίας.

Για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην HPLC-UV/DAD, η ταυτοποίηση των ουσιών έγινε χρησιμοποιώντας τον χρόνο κατακράτησης της κάθε ουσίας και το φάσμα απορρόφησης της στο υπεριώδες (UV). Τα προς ανάλυση φίλτρα UV διαχωρίστηκαν ικανοποιητικά, ενώ στις περιπτώσεις των Eusolex Homosalate και Eusolex 6300 παρατηρήθηκαν δυο κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν

στα cis- , trans- και Z και E γεωμετρικά ισομερή της κάθε ουσίας, αντίστοιχα [42, 76, 307]. Γι αυτές τις ουσίες η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το άθροισμα των κορυφών.

5.3. Δείγματα

5.3.1. Δείγματα Υδάτων

Τα δείγματα των επιφανειακών υδάτων συλλέχθηκαν από την περιοχή της Ηπείρου (*Β.Δ. Ελλάδα*) και περιελάμβαναν νερό ποταμού (*Λούρος*), θάλασσας (*Ιόνιο Πέλαγος*) και λίμνης (*Παμβώτιδα*). Τα νερά συλλέχθηκαν σε γυάλινα δοχεία σκούρου χρώματος και αποθηκεύτηκαν στους 4°C σε σκοτεινό μέρος. Στον Πίνακα 5.1 παρουσιάζονται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τριών διαφορετικών τύπων νερών και του απεσταγμένου που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 5.1: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των υδάτων.

Τύπος ύδατος	pH	Αγωγιμότητα (μmhos/cm)	TDS ^α (mg L ⁻¹)	TOC ^β (mg L ⁻¹)	Αλατότητα (‰)
Απεσταγμένο	5.90	2	n.d. ^γ	κ.ο.α.. ^δ	n.d.
Λίμνη Παμβώτιδα	7.78	325	385	9.89	0.60
Ποταμός Λούρος	7.65	352	120	5.08	0.41
Ιόνιο πέλαγος	7.51	52400	240	1.51	36.2

^α TDS (total dissolved solids): ολικά διαλυμένα στερεά, ^β TOC (total organic carbon): ολικός οργανικός άνθρακας, ^γ n.d. (Not determined): δεν ανιχνεύτηκε, ^δ κ.ο.α.: κάτω από το όριο ανίχνευσης

5.3.2. Δείγματα Εδάφους

Η επικύρωση των **DLLME** και **DLLME-SFO** μεθόδων σε στερεά υποστρώματα, ελέγχθηκε σε δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από την περιοχή της Ηπείρου,

της Πρέβεζας, της Ορεστιάδας και της Κοζάνης. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των επιλεγμένων εδαφών παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.2. Βιβλιογραφική έρευνα, σε στερεά υποστρώματα με τις προαναφερθείσες μεθόδους, φανέρωσε πολύ μικρό αριθμό εργασιών [205, 227].

Πίνακας 5.2: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών.

Εδάφη	OM ^α (%)	OC ^β (%)	Άμμος (%)	Ιλύς (%)	Πηλός (%)	pH
Ήπειρος	5.49	3.19	67	29	4	6.6
Πρέβεζα	1.98	1.15	75	11	14	5.5
Ορεστιάδα	1.91	1.11	45	31	24	7.8
Κοζάνη	0.70	0.41	24	28	48	7.7

^αOM (organic matter): οργανική ύλη

^βOC (organic carbon): οργανικός άνθρακας

5.4. Λειτουργία Των Μονάδων Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων Της Πόλης Των Ιωαννίνων

5.4.1. Γενικά

Η Μονάδα Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων (ΜΕΥΑ) της πόλης των Ιωαννίνων λειτούργησε για πρώτη φορά το 1992 και βρίσκεται στην περιοχή του αεροδρομίου, 5 km έξω από την πόλη των Ιωαννίνων. Στη μονάδα λαμβάνει χώρα δευτεροβάθμια βιολογική επεξεργασία λυμάτων σε συνδυασμό με αναερόβια χώνεψη της λάσπης και παραγωγή βιοαερίου. Η βασική αρχή λειτουργίας των ΜΕΥΑ της πόλης των Ιωαννίνων, βασίζεται στην απομάκρυνση των στερεών συστατικών των απόβλητων με τη διεργασία της καθίζησης και ενίοτε με επίπλευση. Τα διαλυτά μέρη των αποβλήτων μετατρέπονται με βιολογικές και χημικές μεθόδους σε αέρια ή αδιάλυτα στερεά συστατικά. Η βιολογική επεξεργασία των διαλυτών οργανικών συστατικών οδηγεί στην δημιουργία βιομάζας (ιλύς). Η βιομάζα διαχωρίζεται, ως περίσσεια «λάσπη», ενώ παράλληλα πραγματοποιείται πλήρης οξείδωση των οργανικών συστατικών της (~65%) σε CO₂ και H₂O. Επιπλέον, πραγματοποιείται απομάκρυνση του αζώτου και του φωσφόρου. Στην περίπτωση του αζώτου η απομάκρυνση επιτυγχάνεται με δυο τρόπους: ι) την νιτροποίηση και ιι) την απονιτροποίηση, ενώ στην περίπτωση του φωσφόρου με χημική κατακρήμνιση ή με βιολογική αποφωσφόρωση.

5.4.2. Στάδια επεξεργασίας των ΜΕΥΑ

Οι διεργασίες επεξεργασίας και διάθεσης των υγρών αποβλήτων περιλαμβάνουν την πρωτοβάθμια, δευτεροβάθμια και τριτοβάθμια επεξεργασία. Παρακάτω αναφέρονται αναλυτικά:

➤ ΠΡΩΤΟΒΑΘΜΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Στόχος της πρωτοβάθμιας επεξεργασίας είναι η απομάκρυνση των αιωρούμενων και επιπλεόντων στερεών καθώς και η προετοιμασία του αποβλήτου για τη δευτεροβάθμια επεξεργασία. Τα στάδια της πρωτοβάθμιας επεξεργασίας

είναι: i) η εσχάρωση με την οποία απομακρύνονται τα μεγάλα σωματίδια με τη βοήθεια των εσχάρων και ii) η αμμοσυλλογή διαχωρίζοντας και απομακρύνοντας τα ανόργανα συστατικά κοκκώδους μορφής. Τα μη διαλυτά οργανικά συστατικά (πρωτοβάθμια ιλύς) μεταφέρονται περαιτέρω στην πρωτοβάθμια καθίζηση όπου παρακρατούνται μερικώς πριν το απόβλητο εισέλθει στη δευτεροβάθμια επεξεργασία.

☞ ΔΕΥΤΕΡΟΒΑΘΜΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Στόχος της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας είναι η απομάκρυνση των οργανικών συστατικών των υγρών αποβλήτων με αερόβιες βιολογικές διεργασίες (συνιστά τη βιολογική επεξεργασία). Η δευτεροβάθμια επεξεργασία των υγρών αποβλήτων περιλαμβάνει την δεξαμενή αερισμού και τη δευτεροβάθμια καθίζηση. Επιδίωξη των συστημάτων αερισμού, κατά τη διάρκεια επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων, είναι να παρέχουν την κατάλληλη ποσότητα οξυγόνου ώστε να επιτευχθεί η βιολογική οξείδωση καθώς και να αποτρέπουν την μη επιθυμητή καθίζηση στερεών στον βιολογικό αντιδραστήρα [321]. Στην περίπτωση της δευτεροβάθμιας καθίζησης οι διεργασίες που πραγματοποιούνται είναι η πλήρης κατακράτηση της ενεργούς ιλύος, η συμπύκνωση και αποθήκευση της καθώς και η διαρκής κυκλοφορία του ιζήματος της ενεργούς ιλύος στη δεξαμενή αερισμού [322].

☞ ΤΡΙΤΟΒΑΘΜΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Στόχος της τριτοβάθμιας επεξεργασίας είναι η απομάκρυνση των θρεπτικών συστατικών, αζώτου και φωσφόρου, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον ευτροφισμό των φυσικών υδάτων.

Η απομάκρυνση του αζώτου επιτυγχάνεται με τις διαδικασίες νιτροποίησης και απονιτροποίησης όπως παρουσιάζεται παρακάτω:

Νιτροποίηση: Νιτροποίηση είναι η διεργασία κατά την οποία το αμμωνιακό άζωτο οξειδώνεται σε νιτρώδη και στη συνέχεια σε νιτρικά. Η οξείδωση γίνεται σε δυο στάδια:

☞ Οξείδωση προς NO_2^- από τους μικροοργανισμούς της οικογένειας *Nitrosomonas sp.*.

☞ Οξείδωση των NO_2^- προς NO_3^- από τους μικροοργανισμούς της οικογένειας *Nitrobacter sp.*.

Η συνολική αντίδραση (αντίδραση 1) είναι:

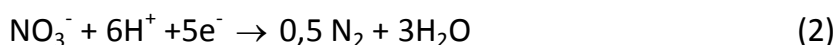


Η αντίδραση γίνεται ταχύτατα σε υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (4.57 Kg O_2 ανά Kg $\text{NH}_4^+ \text{N}$), προκαλώντας μείωση του pH.

Απονιτροποίηση: Απονιτροποίηση είναι η βιολογική διεργασία κατά την οποία ορισμένα βακτήρια (ετερότροφα) ανάγουν το νιτρικό και το νιτρώδες της νιτροποίησης σε μοριακό άζωτο (χαμηλότερη οξειδωτική κατάσταση). Η όλη διεργασία περιλαμβάνει δυο στάδια: ι) την αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη και ιι) την αναγωγή των νιτρωδών σε οξείδιο του αζώτου, υποξείδιο του αζώτου και τέλος σε μοριακό άζωτο:



Η ολική αντίδραση που πραγματοποιείται κατά την διάρκεια επεξεργασίας των λυμάτων παρουσιάζεται παρακάτω (αντίδραση 2):



Ο ρυθμός απονιτροποίησης επηρεάζεται από τέσσερις παράγοντες: τη θερμοκρασία, το διαλυμένο οξυγόνο, το pH (μεταξύ 7 και 8.2) και την ποιότητα του ανθρακούχου ρύπου.

Η απομάκρυνση του φωσφόρου επιτυγχάνεται μέσω χημικών και βιολογικών μεθόδων όπως παρουσιάζεται παρακάτω:

ι) *Χημική απομάκρυνση φωσφόρου*: Η χημική απομάκρυνση του φωσφόρου περιλαμβάνει την κατακρήμνιση των PO_4^{3-} με τη βοήθεια του Fe^{3+} (ως FeCl_3), του Ca^{2+} (ως υδράσβεστος), και του Al^{3+} (ως $\text{Al}(\text{SO}_4)_3 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$) προς σχηματισμό μη-διαλυτών φωσφορικών αλάτων. Από τα προαναφερθέντα, ο FeCl_3 είναι ο πιο αποτελεσματικός καθώς ποσότητα 10 mg L^{-1} είναι αρκετή ώστε να απομακρυνθεί το 90% των υπαρχόντων φωσφορικών. Οι αντιδράσεις (3, 4, 5) που πραγματοποιούνται είναι:



Η διαδικασία κατακρήμνισης των PO_4^{3-} λαμβάνει χώρα στα πλαίσια της μεθόδου της ενεργούς ιλύος.

ιι) *Βιολογική απομάκρυνση του φωσφόρου*: Η απομάκρυνση του φωσφόρου από τα υγρά απόβλητα με βιολογικές μεθόδους βασίζεται στην ικανότητα ορισμένων αερόβιων βακτηρίων να αποθηκεύουν μεγαλύτερες ποσότητες φωσφόρου από ότι χρειάζονται κατά την διαδικασία της αερόβιας ανάπτυξης τους.

5.4.3. Δείγματα Από Τις Μονάδες Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων (ΜΕΥΑ) Της Πόλης Των Ιωαννίνων.

Τα δείγματα από την ΜΕΥΑ της πόλης των Ιωαννίνων συλλέχθηκαν τους μήνες Νοέμβριο και Δεκέμβριο του 2009. Η συλλογή των υδάτων έγινε σε γυάλινα δοχεία σκούρου χρώματος και η επεξεργασία τους λάμβανε χώρα την ίδια μέρα. Στην περίπτωση της ενεργούς ιλύος, η συλλογή της έγινε με τη χρήση ενός εργαλείου ειδικής κατασκευής. Τα δείγματα αποθηκευόταν σε πλαστικά δοχεία και φυλασσόταν στους -20°C μέχρι την επεξεργασία τους, η οποία γινόταν εντός 48 ωρών.

5.5. Επιμόλυνση Και Τρόπος Αποφυγής

Οι PCMs, οι PAEs και τα φίλτρα UV χρησιμοποιούνται ευρέως και σε υψηλές συγκεντρώσεις στα Προϊόντα Προσωπικής Περιποίησης και στα πλαστικά σκεύη. Αυτό οδηγεί σε επιμόλυνση των εργαστηριακών σκευών και των διαλυτών καταλήγοντας σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας [308 309]. Γι αυτούς τους λόγους αποφεύχθηκε, όσο ήταν δυνατό, η χρήση απορρυπαντικού διαλύματος και πλαστικών σκευών (σωληνάκια, σύριγγες κ.τ.λ.). Τα γυάλινα σκεύη που χρησιμοποιούνταν, καθαρίζονταν μετά από κάθε χρήση, διαδοχικά με απεσταγμένο νερό, ακετόνη και εξάνιο ενώ στο τέλος κάθε εργαστηριακής μέρας τοποθετούνταν στο πυριαντήριο στους 300° C για 24h. Επιπλέον, τυφλά πειράματα πραγματοποιούνταν κάθε μέρα, ώστε να ελεγχθεί η καθαρότητα των διαλυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ
ΤΗΣ DLLME ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΥΔΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΦΙΛΤΡΩΝ
UV, PCMs ΚΑΙ ΡΑΕs ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ
ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ.**

6.1. Βελτιστοποίηση της Υγρής Υγρής Μικροεκχύλισης Διασποράς (DLLME) σε επιφανειακά ύδατα για τα φίλτρα UV

6.1.1. Χρωματογραφική τεχνική

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας HPLC-UV/DAD χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των φίλτρων UV. Εφαρμόστηκε σύστημα βαθμωτής έκλουσης με κινητή φάση αποτελούμενη από ακετονιτρίλιο και νερό. Η ταχύτητα ροής ρυθμίστηκε σε 1 mL min^{-1} , η θερμοκρασία του φούρνου 28°C , ενώ ο όγκος έγχυσης ήταν 20 μL . Ο ανιχνευτής ρυθμίστηκε: στα 300 nm για τα Eusolex 6300, OD-PABA και Octylsalicylate, στα 239 nm για το Eusolex Homosalate (HMS), στα 290 nm για το Eusolex 4360 και στα 355 nm για το Eusolex 9020. Οι μεταβολές στη σύσταση των εκλουστικών διαλυμάτων σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 6.1:

Πίνακας 6.1 : Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης ακετονιτρίλιου – νερού.

Χρόνος (λεπτά)	Διαλύτες έκλουσης	
	Ακετονιτρίλιο	Νερό
0	75	25
4	92	8
11	92	8
18	75	25
20	75	25

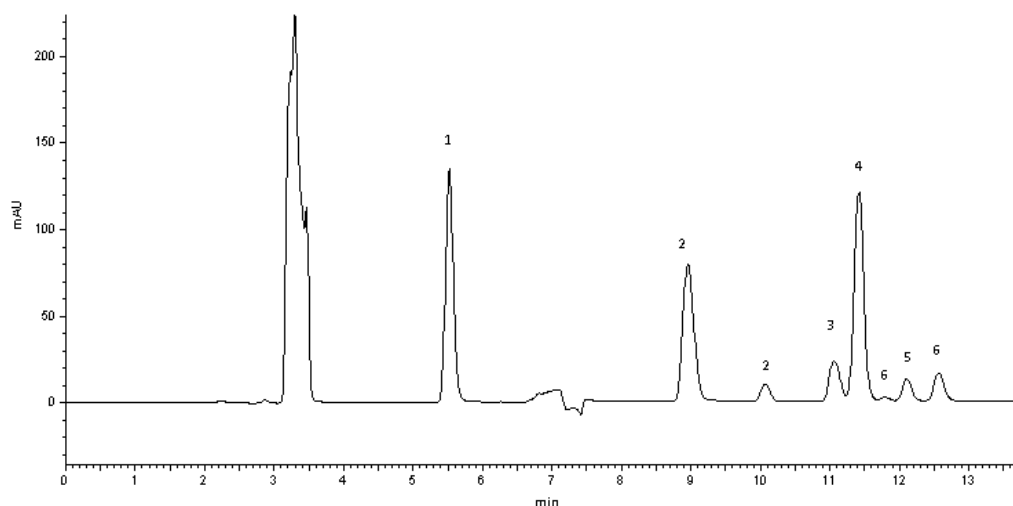
Στον Πίνακα 6.2 παρουσιάζονται οι χρόνοι κατακράτησης και τα μήκη κύματος για κάθε αναλύτη ξεχωριστά.

Πίνακας 6.2: Χρόνοι κατακράτησης και μήκη κύματος των φίλτρων UV.

Φίλτρα UV	Μήκος κύματος (nm)	t_R^*
E4360	290	5.52
E6300	300	E6300 1: 8.87 E6300 2: 9.05
E9020	355	13.36
OD-PABA	300	14.40
Octylsalicylate	300	15.34
HMS	239	HMS ₁ : 14.87 HMS ₂ : 15.92

* t_R = Χρόνος κατακράτησης

Ο τρόπος έκλουσης των αναλυτών εξαρτάται από την πολικότητα τους, με τις περισσότερες πολικές να εκκλύονται πρώτες. Στο Κεφάλαιο 1, έχουμε αναφέρει ότι τα επιλεγμένα φίλτρα UV χαρακτηρίζονται ως μη πολικά μόρια ή μετρίως πολικά, με τις τιμές $\log K_{ow}$ να κυμαίνονται από 3.53 έως 6.16. Έτσι η σειρά έκλουσης τους είναι: E4360 > E6300 > E9020 > OD-PABA > octylsalicylate > HMS. Στο σχήμα 10 παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα των επιλεγμένων φίλτρων UV στα 300 nm, σε συγκέντρωση 5 mg L⁻¹ σε C₂Cl₄.



Σχήμα 10: Χρωματογράφημα HPLC/UV-DAD των επιλεγμένων φίλτρων UV στα 300nm σε συγκέντρωση 5 mg L^{-1} : (1) E4360, (2) E6300, (3) E9020, (4) OD-PABA, (5) Octylsalicylate και (6) HMS.

Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση καμπύλης αναφοράς, 7 σημείων, από πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης στον διαλύτη εκχύλισης σε συνάρτηση με τα εμβαδά των κορυφών των αντίστοιχων αναλυτών. Στον Πίνακα 6.3 παρουσιάζονται οι παράμετροι της γραμμικότητας του οργάνου για κάθε ένα αναλύτη.

Πίνακας 6.3: Παράμετροι γραμμικότητας του οργάνου

	E4360	E6300	OD-PABA	E9020	Octylsalicylate	HMS
Εύρος (mg L ⁻¹)	0.1-10.0	0.1-10.0	0.1-10.0	0.1-10.0	0.1-10.0	0.1-10.0
Σημείο τομής (α)	221163	190882	191320	208833	23375	57799
Κλίση (b)	-8176.0	2158.6	-24047	-5255.2	-3211.7	-4620.2
Συντελεστής συσχέτισης (r)	0.9996	0.9997	0.9996	0.9996	0.9996	0.9996
Συντελεστής προσδιορισμού (r ²)	0.9991	0.9995	0.9991	0.9992	0.9992	0.9992

6.1.2. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς (*DLLME*)

5 mL υδατικού δείγματος τοποθετούνται σε γυάλινο φυγοκεντρικό σωλήνα και εμβολιάζονται με το μίγμα των φίλτρων UV σε συγκέντρωση 25 μg L⁻¹. Στη συνέχεια, 2.07 mL CH₃CN (διαλύτης διασποράς) αναμιγνύονται με 51.60 μL C₂Cl₄ (διαλύτης εκχύλισης) και εμβολιάζονται άμεσα εντός του υδατικού διαλύματος. Το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς, σχηματίζοντας πολλές μικρές σταγόνες (θόλωμα) οι οποίες διασπείρονται σε όλη την επιφάνεια του διαλύματος, με τους αναλύτες να εκχυλίζονται εντός αυτών. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετείται στην φυγόκεντρο για 8.5 min στις 4000 στροφές. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης η καταβυθιζόμενη φάση απομακρύνεται και εγχέεται στο χρωματογράφο.

6.1.3. Προκαταρκτικά Πειράματα

Τα προκαταρκτικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν με στόχο τον προσδιορισμό του κατάλληλου συνδυασμού διαλυτών εκχύλισης και διασποράς. Η επιλογή αυτών έγινε με γνώμονα τα κριτήρια που έχουμε ήδη αναφέρει στο

Κεφάλαιο 2. Οι διαλύτες εκχύλισης και διασποράς που επιλέχθηκαν ήταν: τετραχλωροαιθέριο (C_2Cl_4), τετραχλωράνθρακας (CCl_4), χλωροφόρμιο ($CHCl_3$) και ακετονιτρίλιο (ACN), μεθανόλη (MeOH), ακετόνη (Ac), αντίστοιχα.

Επιλογή διαλύτη εκχύλισης

Για την επιλογή του διαλύτη εκχύλισης ελέγχθηκαν όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί διαλυτών εκχύλισης (C_2Cl_4 , CCl_4 , $CHCl_3$, 40 μ L) και διασποράς (ACN, MeOH, Ac, 1.5 mL). Από τα πειραματικά δεδομένα διαπιστώθηκε ότι ο CCl_4 ήταν αδύνατο να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης εκχύλισης καθώς η κορυφή του στο χρωματογράφημα υπερκάλυπτε τους αναλύτες καθιστώντας αδύνατη την όποια διεργασία. Εν συνεχεία, το $CHCl_3$ μόνο σε συνδυασμό με το διαλύτη διασποράς ACN, σχημάτιζε τις δυο επιθυμητές φάσεις του συστήματος, με την απόδοση της εκχύλισης να κυμαίνεται σε χαμηλές τιμές, αποκλείοντας τον. Εν κατακλείδι, η επιλογή του διαλύτη εκχύλισης C_2Cl_4 ήταν η καταλληλότερη καθώς η χρωματογραφική του συμπεριφορά ήταν η επιθυμητή ενώ οι δυο φάσεις του συστήματος σχηματίζονταν ικανοποιητικά με την καταβυθιζόμενη φάση να απομονώνεται εύκολα. Γι αυτούς τους λόγους ως διαλύτης εκχύλισης επιλέχθηκε το C_2Cl_4 .

Επιλογή διαλύτη διασποράς

Αφού επιλέχθηκε ο διαλύτης εκχύλισης, επόμενο στάδιο ήταν η επιλογή του διαλύτη διασποράς. Διατηρώντας σταθερό τον όγκο του C_2Cl_4 (40 μ L) και επιλέγοντας κάθε φορά διαφορετικό διαλύτη διασποράς (σε όγκο 1.5 mL) πραγματοποιήθηκαν τα προκαταρκτικά πειράματα. Τα πειραματικά δεδομένα υπέδειξαν ότι οι διαφορετικοί συνδυασμοί μεταξύ των διαλυτών επιφέρουν αύξηση του όγκου καταβύθισης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ανάκτησης της μεθόδου. Έτσι από τους επιλεγμένους διαλύτες και με βάση τα αποτελέσματα των αναλύσεων, το ACN επιλέχθηκε ως διαλύτης διασποράς.

6.1.4. Πολυπαραγοντική Μέθοδος

Για να μπορέσουμε να αναπτύξουμε ικανοποιητικά τη νέα **DLLME** μέθοδο για τον προσδιορισμό των φίλτρων UV σε υδατικά δείγματα κρίνεται απαραίτητη η μελέτη και η βελτιστοποίηση των παραμέτρων που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Γι αυτό το λόγω πραγματοποιήθηκε ένας κλασματικός πειραματικός σχεδιασμός δυο σταδίων. Αρχικά εφαρμόστηκε ο σχεδιασμός αξιολόγησης (*Plackett-Burman*), προκειμένου να προσδιοριστούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόκριση (εκφραζόμενη ως ανάκτηση) και στη συνέχεια ένας σχεδιασμός βελτιστοποίησης (*Central Composite Design (CCD)*). Οι πειραματικοί σχεδιασμοί και η εξαγωγή των αποτελεσμάτων έγιναν με τη χρήση του προγράμματος STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

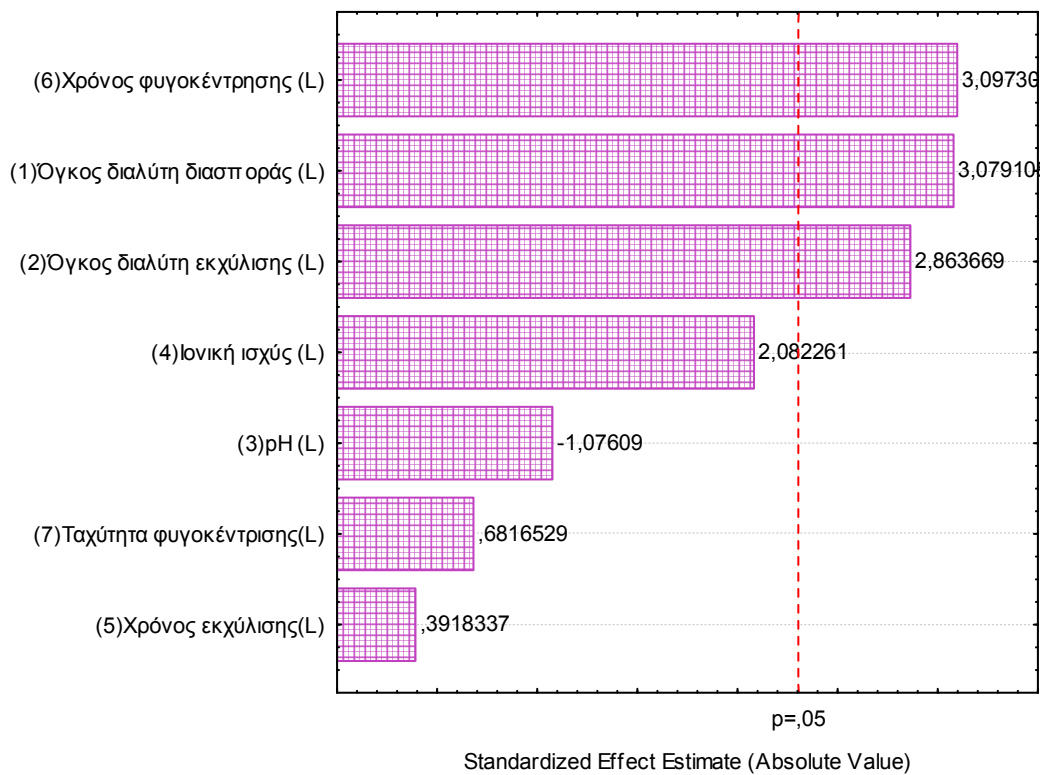
6.1.4.1. Σχεδιασμός Αξιολόγησης Plackett-Burman

Ένας 2^{7-4} σχεδιασμός αξιολόγησης εφαρμόστηκε προκειμένου να προσδιοριστούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόκριση της μεθόδου. Κάθε παράγοντας εξετάσθηκε σε δυο επίπεδα: (-1) το χαμηλότερο και (+1) το υψηλότερο, ενώ τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν από δυο φορές και με τυχαία σειρά ώστε να εκτιμηθεί το πειραματικό σφάλμα και να ελεγχθεί η ορθότητα του μοντέλου. Συνολικά, ο πειραματικός σχεδιασμός αποτελείται από δεκαέξι πειράματα με τους προς ανάλυση παράγοντες να είναι: ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης (μL), ο όγκος του διαλύτη διασποράς (mL), το pH, η ιοντική ισχύς (NaCl, w/v %), ο χρόνος εκχύλισης (min), ο χρόνος φυγοκέντρησης (min) και η ταχύτητα φυγοκέντρησης (rpm). Ως μετρήσιμη απόκριση χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή των ανακτήσεων των ουσιών για κάθε σειρά πειραμάτων (R%). Οι παράγοντες, οι κωδικοποιημένες τιμές και τα επίπεδα τιμών τους παρατίθενται στον Πίνακα 6.4.

Πίνακας 6.4: Οι πειραματικοί παράγοντες, οι κωδικοποιημένες τιμές, τα επίπεδα τιμών τους για τον πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman.

Παράγοντες	Κωδικοποιημένες τιμές	Επίπεδα	
		Χαμηλό (-1)	Υψηλό(+1)
Όγκος διαλύτη διασποράς (mL)	V ₁	0.5	2.0
Όγκος διαλύτη εκχύλισης (μL)	V ₂	30	60
pH	V ₃	3	11
Ιοντική ισχύς (NaCl, w/v %)	V ₄	0	5
Χρόνος εκχύλισης (min)	V ₅	1	3
Χρόνος φυγοκέντρωσης (min)	V ₆	2	10
Ταχύτητα φυγοκέντρωσης (rpm)	V ₇	1000	4000

Σειρά	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	V ₆	V ₇
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1
4	-1	1	1	-1	-1	1	-1
5	1	-1	-1	-1	-1	1	1
6	-1	1	-1	-1	1	1	1
7	-1	-1	1	1	-1	-1	1
8	-1	-1	1	1	-1	-1	1
9	-1	-1	-1	1	1	-1	-1
10	1	1	-1	1	-1	-1	-1
11	-1	1	-1	-1	1	-1	1
12	1	-1	-1	-1	-1	1	1
13	-1	1	1	-1	-1	1	-1
14	1	-1	1	-1	1	-1	-1
15	1	-1	1	-1	1	-1	-1
16	1	1	-1	1	-1	-1	-1



Σχήμα 11: Απεικόνιση του διαγράμματος Pareto για τον 2^{7-4} πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman.

Πίνακας 6.5. Αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για τον 2^{7-4} πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman.

	Επίδραση	Σταθερές	t	p ^a
Αλληλεπίδραση	57.86	57.86	22.73	0.000
V ₁	15.67	7.83	3.08	0.015
V ₂	14.57	7.28	2.86	0.021
V ₃	-5.47	-2.73	-1.07	0.313
V ₄	10.60	5.30	2.08	0.071
V ₅	1.99	0.99	0.39	0.705
V ₆	15.78	7.88	3.09	0.014
V ₇	3.47	1.73	0.68	0.514

^ap = πιθανότητα, όταν $p < 0.05$ η επίδραση θεωρείται στατιστικά σημαντική ,

*Σταθερά προσδιορισμού $R^2 = 0.807$ και η ρυθμιζόμενη σταθερά $R^2 = 0.637$ (η τιμή είναι παραπλήσια με το R^2 με μόνη διαφορά ότι υπολογίζονται οι βαθμοί ελευθερίας δηλαδή $R^2 \text{ (adjusted)} = 1 - [(Residual \text{ SS}/df)/(Total \text{ SS}/df)]$)

Στη συνέχεια βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 6.5) και το διάγραμμα Pareto (*Pareto-chart*) (σχήμα 11) για το εκτιμώμενο μοντέλο, προσδιορίσθηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Από την ανάλυση του διαγράμματος Pareto (σχήμα 11) διαπιστώθηκε ότι, οι παράγοντες των οποίων η οριζόντια στήλη εκτείνεται στα δεξιά της κάθετης γραμμής επηρεάζουν σημαντικά το σύστημα σε διάστημα εμπιστοσύνης $> 95\%$. Οι θετικές ή αρνητικές τιμές που παρουσιάζονται στα δεξιά της κάθε στήλης, εκφράζουν την απόκριση η οποία αυξάνεται ή μειώνεται, αντίστοιχα, καθώς διερχόμαστε από το χαμηλό (-1) στο υψηλό (+1) επίπεδο [310]. Επιπλέον, από την ανάλυση των δεδομένων του Πίνακα 6.5 διαπιστώνεται ότι οι παράγοντες V₁, V₂ και V₆ επηρεάζουν την απόκριση της μεθόδου (τιμή $p < 0.05$). Από

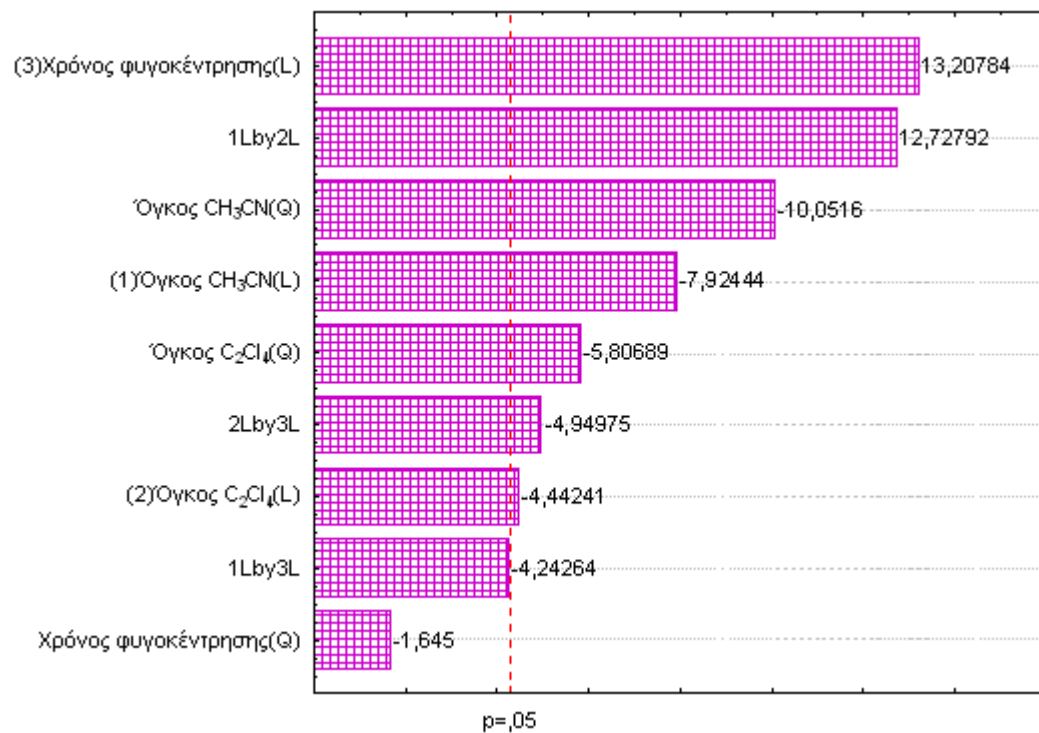
τους αναλυμένους παράγοντες, ο χρόνος φυγοκέντρωσης (V_6) είναι στατιστικά ο πιο σημαντικός, επιδρώντας θετικά στην απόκριση, ακολουθούμενος από τον όγκο του διαλύτη διασποράς (V_1) και τον όγκο του διαλύτη εκχύλισης (V_2). Οι παράγοντες αυτοί επιλέχθηκαν για το επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, με την ιοντική ισχύς, το pH, την ταχύτητα φυγοκέντρωσης και τον χρόνο εκχύλισης να απορρίπτονται καθώς δεν επηρεάζουν τις αποκρίσεις στο επιλεγμένο διάστημα εμπιστοσύνης.

6.1.4.2. Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)

Το επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας είναι η βελτιστοποίηση των επιπέδων των επιλεγμένων παραγόντων με στόχο την επίτευξη υψηλών ανακτήσεων (R%). Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν ήταν: (1) ο όγκος του διαλύτη διασποράς (V_1), (2) ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης (V_2) και (3) ο χρόνος φυγοκέντρωσης (V_6), με την ταχύτητα φυγοκέντρωσης να διατηρείται σταθερή στις 4000 στροφές (rpm) καθ' όλη τη διάρκεια. Ο πειραματικός σχεδιασμός που εφαρμόστηκε ήταν ένα 2^3 κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός με τρεις παράγοντες ($n=3$) οι οποίοι ελέχθησαν σε πέντε επίπεδα (-1.682, -1, 0, 1, 1.682) με τρία κεντρικά σημεία (*central points*) (Πίνακας 6.6). Συνολικά πραγματοποιήθηκαν δεκαεπτά πειράματα ($N = 2^k + 2k + c_p = 2^3 + 2*3 + 3 = 17$) με τυχαία σειρά.

Πίνακας 6.6: Σύνολο δεδομένων του Κεντρικού Σύνθετου Σχεδιασμού (CCD).

Παράγοντες	Επίπεδα			Αξονικά σημεία ($\alpha = 1.682$)	
	Χαμηλό (-1)	Κεντρικό (0)	Υψηλό (+1)	- α	+ α
(V ₁) Όγκος CH ₃ CN (mL)	2.25	2.50	2.75	2.07	2.92
(V ₂) Όγκος C ₂ Cl ₄ (μL)	50.00	60.00	70.00	43.18	76.81
(V ₆) Χρόνος φυγοκέντρωσης (min)	3.00	5.00	7.00	1.63	8.36
Σειρά	V ₁	V ₂	V ₆		
1	-1	-1	-1		
2	-1	-1	1		
3	-1	1	-1		
4	-1	1	1		
5	1	-1	-1		
6	1	-1	1		
7	1	1	-1		
8	1	1	1		
9	- α	0	0		
10	+ α	0	0		
11	0	- α	0		
12	0	+ α	0		
13	0	0	- α		
14	0	0	+ α		
15	0	0	0		
16	0	0	0		
17	0	0	0		



Σχήμα 12: Απεικόνιση του διαγράμματος Pareto για το CCD.

Πίνακας 6.7: Αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για τον προτεινόμενο πειραματικό σχεδιασμό.

	SS ^a	df ^b	MS ^c	F-τιμή ^d	ρ-τιμή Πιθανότητα > F	Παρατηρήσεις
Μοντέλο	724.71	9	80.52	66.54	< 0.0001	Σημαντική
V ₁	75.98	1	75.98	62.79	0.016	
V ₂	23.87	1	23.87	19.74	0.047	
V ₆	211.08	1	211.08	174.45	0.006	
V ₁ ²	122.25	1	122.25	101.03	0.009	
V ₂ ²	40.80	1	40.80	33.72	0.028	
V ₆ ²	3.27	1	3.27	2.71	0.241	
V ₁ V ₂	199.02	1	199.02	166.00	0.006	
V ₁ V ₆	21.78	1	21.78	18.00	0.051	
V ₂ V ₆	29.65	1	29.65	24.50	0.038	
LOF ^e	45.20	5	9.04	7.47	0.122	Ασήμαντη
Σφάλμα	2.42	2	1.21			
Συνολικό SS	739.95	16				

^aSS = άθροισμα των τετραγώνων

^bdf = βαθμοί ελευθερίας

^cMS = μέσα τετράγωνα

^dF-τιμή= F –δοκιμή που εκτιμά τις διακυμάνσεις ξεχωριστά και εκφράζει τα σχετικά τους μεγέθη

^eLOF (lack of fit) = Συγκρίνει το σφάλμα που προέρχεται από το προτεινόμενο μοντέλο, προς το σφάλμα που προέρχεται από τις επαναλήψεις που πραγματοποιούνται ή από τα κεντρικά σημεία.

Συντελεστής προσδιορισμού $R^2 = 0.93565$ και η ρυθμιζόμενη σταθερά προσδιορισμού $R^2 = 0.85291$

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 6.7) και το διάγραμμα Pareto (σχήμα 12), χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία και

ερμηνεία των δεδομένων. Η ορθότητα του προτεινόμενου μοντέλου ελέγχθηκε με τη βοήθεια της ANOVA (Πίνακας 6.7), με τις παραμέτρους F , R^2 , LOF (*lack of fit*), να χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό του. Η υψηλή τιμή της παραμέτρου F ($F=66.54$) σε συνδυασμό με τη χαμηλή τιμή $p < 0.0001$ υποδεικνύει ότι το προτεινόμενο μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό [311]. Από το διάγραμμα Pareto διαπιστώνονται επιδράσεις πρώτου (*linear*, L) και δευτέρου βαθμού (*quadratic*, Q) αλλά και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων. Η πρώτη αλληλεπίδραση που παρατηρείται και επηρεάζει στατιστικά σημαντικά την ανάκτηση της μεθόδου, είναι ανάμεσα στους όγκους των CH_3CN και C_2Cl_4 (V_1V_2) και η δεύτερη ανάμεσα στον όγκο του CH_3CN και το χρόνο φυγοκέντρωσης (V_2V_3). Επιπλέον στατιστικά σημαντικές χαρακτηρίζονται οι επιδράσεις των παραγόντων V_6 , V_1^2 , V_1 , V_2^2 , V_2 . Η ορθότητα του προτεινόμενου μοντέλου εκτιμάται με την παράμετρο « LOF », που εκφράζει την απόδοση του μοντέλου [312]. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, δεν βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική με $p > 0.05$ ενώ ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 υπολογίστηκε στα 0.93565 εκφράζοντας ότι το 93.57 % της διακύμανσης της απόκρισης μπορεί να ερμηνευτεί από το προτεινόμενο μοντέλο [313].

Τέλος, μια δευτέρου βαθμού πολυωνυμική εξίσωση της ανάκτησης ($R\%$) αναπτύχθηκε για να εκφράσει το προτεινόμενο μοντέλο (εξίσωση 28):

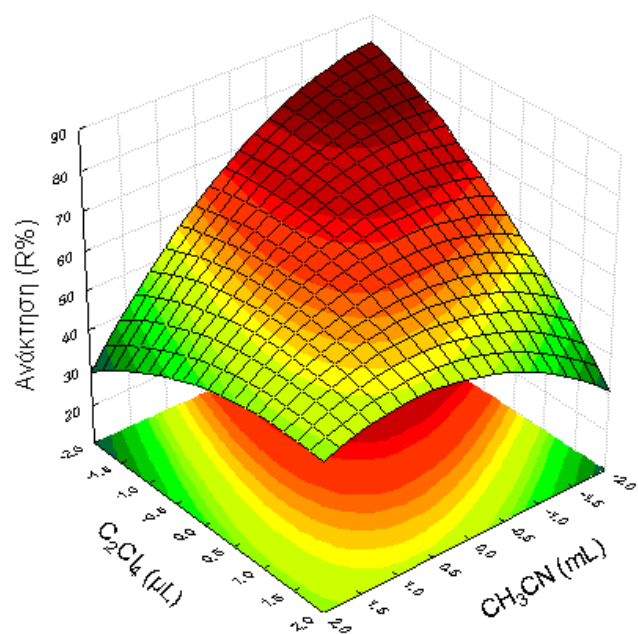
$$R\% = 68.06 - 2.34V_1 - 1.32V_2 + 3.93V_6 - 23.24V_1^2 - 1.91V_2^2 + 4.95V_1V_2 - 1.92V_2V_6 \quad (28)$$

όπου V_1 , V_2 και V_6 είναι οι κωδικοποιημένες τιμές των επιλεγμένων παραγόντων.

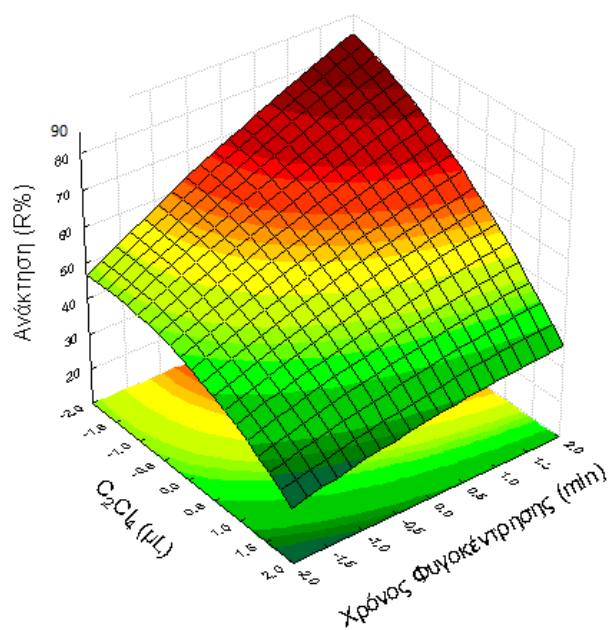
Σύμφωνα με την εξίσωση 28, η θετική τιμή του συντελεστή του παράγοντα V_6 (+3.93) εκφράζει την τάση της ανάκτησης ($R\%$) να αυξάνει από το χαμηλό στο υψηλό επίπεδο τιμών ενώ οι αρνητικές τιμές των συντελεστών των παραγόντων V_1 και V_2 (-2.34 και -1.32, αντίστοιχα) έχουν αντίθετη επίδραση [314]. Στην περίπτωση των αλληλεπιδράσεων V_1V_2 και V_2V_6 , η θετική τιμή (+4.95) του συντελεστή της

αλληλεπίδρασης V_1V_2 εκφράζει την συνεργατική σχέση μεταξύ των δυο παραγόντων ενώ η αρνητική (-1.92) του συντελεστή V_2V_6 την ανταγωνιστική σχέση [314].

Επόμενο βήμα είναι ο προσδιορισμός των βέλτιστων τιμών των τριών παραγόντων (V_1 , V_2 , V_6). Στο σχήμα 13 απεικονίζονται σε τρισδιάστατη μορφή (3D) οι αλληλεπιδράσεις «όγκος C_2Cl_4 - όγκος CH_3CN » (σχήμα 13α) και «όγκος C_2Cl_4 - χρόνος φυγοκέντρωσης» (σχήμα 13β). Σε κάθε περίπτωση περιγράφεται η επίδραση των δυο παραγόντων διατηρώντας τον τρίτο παράγοντα σταθερό, ενώ ο κάθετος άξονας εκφράζει την ανάκτηση της μεθόδου (R%).



(α)



(β)

Σχήμα 13: Τρισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που επηρεάζουν την απόκριση της μεθόδου (α) «όγκος C_2Cl_4 - όγκος CH_3CN » και (β) «όγκος C_2Cl_4 -χρόνος φυγοκέντρησης».

Από το σχήμα 13α παρατηρούμε ότι όταν χρησιμοποιείται μικρός όγκος διαλύτη εκχύλισης και μεγάλος όγκος διαλύτη διασποράς η ανάκτηση της μεθόδου είναι αρκετά χαμηλή (~ 30%). Η αύξηση του όγκου του διαλύτη διασποράς οδηγεί σε αύξηση της διαλυτότητας των φίλτρων UV εντός του υδατικού διαλύματος με επακόλουθο την μείωση της ανάκτησης [185]. Το σύστημα έχει την ίδια συμπεριφορά και στην περίπτωση που χρησιμοποιείται υψηλός όγκος διαλύτη εκχύλισης και χαμηλός όγκος διαλύτη διασποράς. Ο μικρός όγκος του διαλύτη διασποράς δεν επαρκεί ώστε να διασπείρει κατάλληλα τον διαλύτη εκχύλισης εντός του υδατικού διαλύματος, καθιστώντας αδύνατο το σχηματισμό του απαραίτητου για την εκχύλιση θολώματος [173]. Σύμφωνα με το διάγραμμα η μέγιστη ανάκτηση (~80%) παρατηρείται όταν χρησιμοποιείται ταυτόχρονα μικρός όγκος διαλύτη εκχύλισης (43-50 μL) και διασποράς (2-2.2 mL).

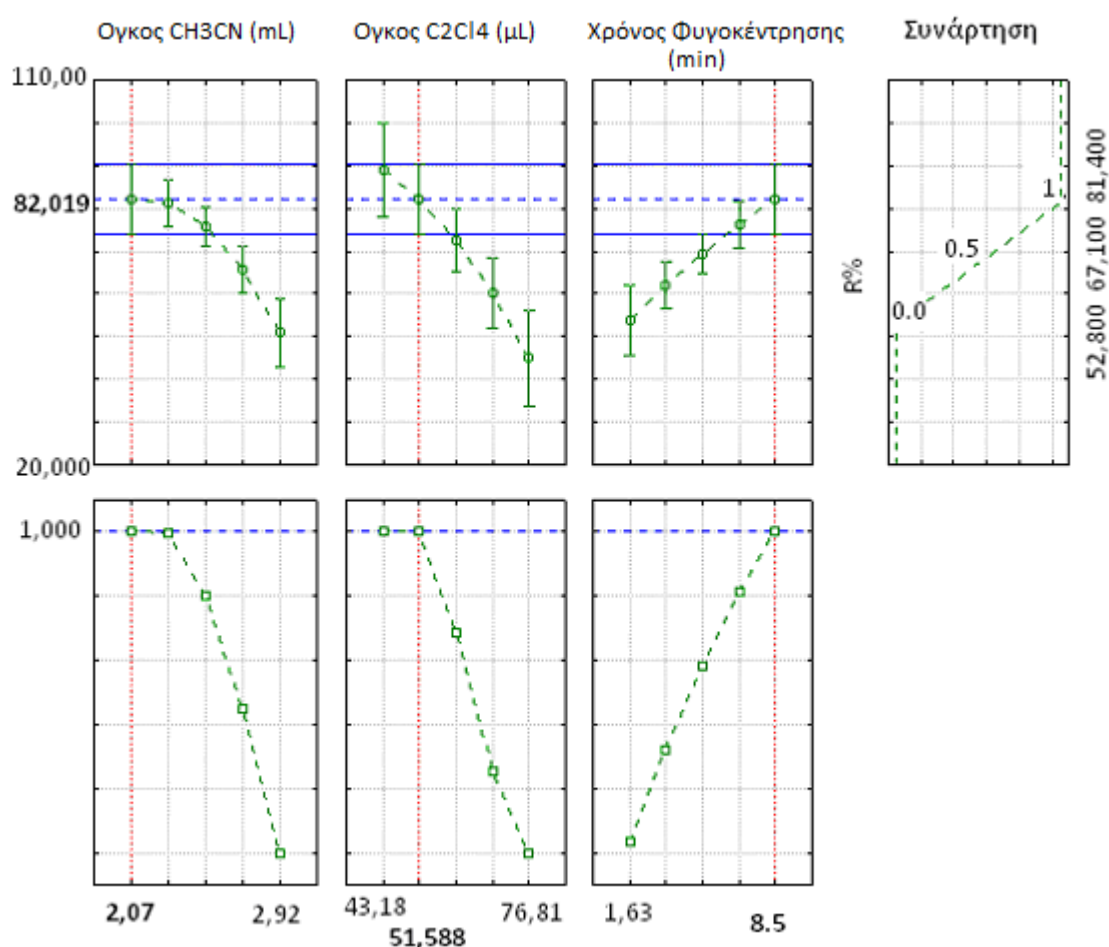
Στο δεύτερο σχήμα 13β, απεικονίζεται η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο όγκο του C_2Cl_4 και το χρόνο φυγοκέντρωσης. Ο χρόνος φυγοκέντρωσης είναι στατιστικά σημαντικός παράγοντας για την **DLLME** μέθοδο, καθώς χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των δυο φάσεων. Από το σχήμα παρατηρούμε ότι για υψηλό όγκο διαλύτη εκχύλισης και μικρό χρόνο φυγοκέντρωσης η ανάκτηση ήταν σε χαμηλά επίπεδα (~35%). Αντίθετα, υψηλή ανάκτηση (~88%) παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε μικρός όγκος διαλύτη εκχύλισης και μεγάλος χρόνος φυγοκέντρωσης. Η συμπεριφορά αυτή του συστήματος οφείλεται στο ότι ο χρόνος φυγοκέντρωσης ήταν αρκετός ώστε να καταβυθιστεί ικανοποιητικά όλη η ποσότητα του διαλύτη εκχύλισης (C_2Cl_4) [279].

6.1.4.3. Βελτιστοποίηση Με Τη Μέθοδο Της Επιθυμητής Συνάρτησης (Desirability Function)

Για να πραγματοποιηθεί η βελτιστοποίηση των παραγόντων με τη μέθοδο της επιθυμητής συνάρτησης, λήφθηκαν υπόψη τα αποτελέσματα από τον CCD σχεδιασμό. Στα δεξιά του σχήματος 14 απεικονίζονται τα δεδομένα της επιθυμητής

συνάρτησης για κάθε παράγοντα: η κωδικοποιημένη τιμή 1.0 εκφράζει τη μέγιστη ανάκτηση (81.4%), η 0.0 την ελάχιστη (52.8%) και 0.5 την ενδιάμεση (67.1%). Στο αριστερό κάτω τμήμα του σχήματος βρίσκονται οι βέλτιστες τιμές για κάθε μια παράμετρο ξεχωριστά σύμφωνα με τον μέσο όρο της ανάκτησης.

Με βάση τους υπολογισμούς που πραγματοποιήθηκαν από το πρόγραμμα, η μέγιστη ανάκτηση της μεθόδου υπολογίστηκε στο 82.02%, με τις βέλτιστες τιμές για κάθε παράμετρο να είναι: CH₃CN 2.07 mL, C₂Cl₄ 51.6 μL και χρόνος φυγοκέντρησης 8.5 min. Για να επαληθευτούν οι παραπάνω τιμές πραγματοποιήθηκαν επαναληπτικά πειράματα με τις βέλτιστες συνθήκες. Οι τιμές των ανακτήσεων που ελήφθησαν ήταν αρκετά κοντά με την μέγιστη ανάκτηση που υπολογίστηκε από το μαθηματικό μοντέλο.

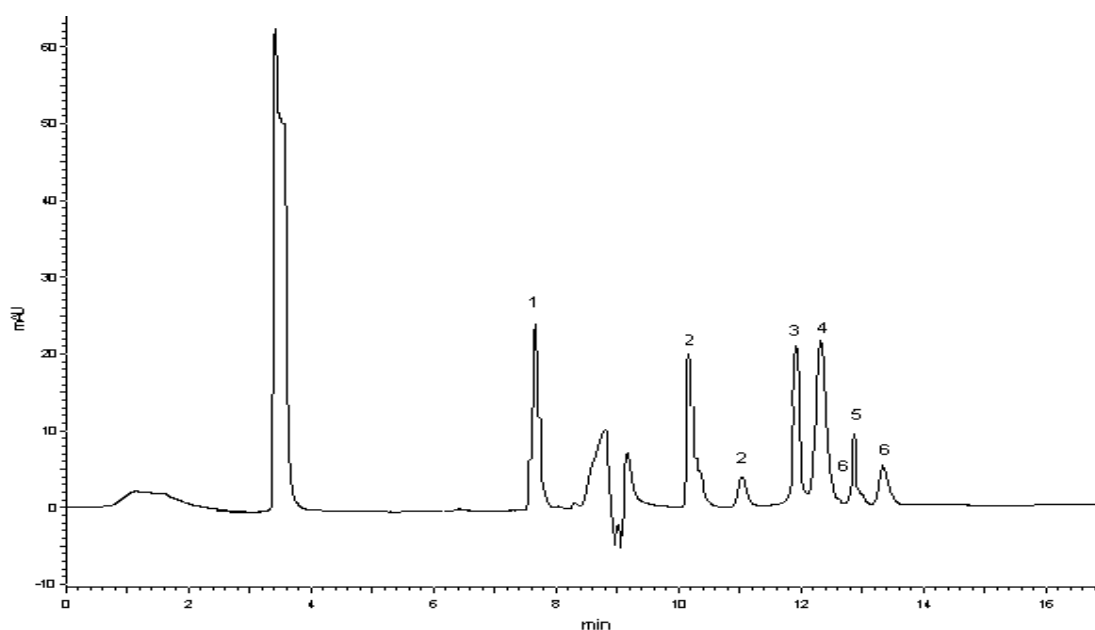


Σχήμα 14: Οι προβλεπόμενες τιμές για τα φίλτρα UV.

6.1.5. Επικύρωση της **DLLME** μεθόδου

6.1.5.1. Γραμμικότητα, πιστότητα και ευαισθησία της μεθόδου

Η επικύρωση της **DLLME** μεθόδου ελέγχθηκε σε νερό πηγής εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν, σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g L}^{-1}$ μίγματος φίλτρων UV. Στο σχήμα 15 φαίνεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος στα 300 nm με το μίγμα των επιλεγμένων αναλυτών σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g L}^{-1}$.



Σχήμα 15: Χρωματογράφημα HPLC/UV-DAD ύστερα από εκχύλιση με την μέθοδο **DLLME** των επιλεγμένων φίλτρων UV σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g L}^{-1}$: (1) E4360, (2) E6300, (3) E9020, (4) OD-PABA, (5) Octylsalicylate, (6) HMS.

Η γραμμικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με τον υπολογισμό των σταθερών προσδιορισμού r^2 . Το εύρος γραμμικότητας των αναλυτών κυμάνθηκε από 0.2 έως $500 \mu\text{g L}^{-1}$, με σταθερές προσδιορισμού μεγαλύτερες ή ίσες με 0.9990. Η πιστότητα (αναπαραγωγικότητα) της μεθόδου, προσδιορίσθηκε με επανάληψη των αναλύσεων στο σύστημα χρωματογραφίας σε τρεις διαδοχικές ημέρες ($n=5 \times 3$ μέρες) εμβολιασμένου δείγματος με γνωστή συγκέντρωση του μίγματος των αναλυτών (25

μg L⁻¹), ενώ η ημερήσια πιστότητα προσδιορίσθηκε με επανάληψη των αναλύσεων την ίδια ημέρα (n=15 δείγματα) για την ίδια συγκέντρωση μίγματος. Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) δεν ξεπέρασαν το 9.3%, και 13.1% αντίστοιχα. Υπολογίστηκαν επίσης τα όρια ανίχνευσης (LOD_s) και ποσοτικοποίησης (LOQ_s) της προτεινόμενης μεθόδου. Ως όριο ανίχνευσης ορίστηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία ο λόγος του σήματος (S) προς τον θόρυβο (N) ήταν μεγαλύτερος ή ίσος με 3 (S/N ≥ 3) και το όριο ποσοτικοποίησης ως η χαμηλότερη συγκέντρωση για την οποία ο ίδιος λόγος ήταν τουλάχιστον ίσος με 10. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου κυμάνθηκαν από 60.6 έως 605 ng L⁻¹ για όλους τους αναλύτες. Όλα τα δεδομένα επικύρωσης της μεθόδου παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.8.

Πίνακας 6.8: Γραμμικότητα, πιστότητα, όρια ανίχνευσης (LOD_s) και ανακτήσεις (R%) σε νερό πηγής με τη μέθοδο DLLME για τα φίλτρα UV.

Αναλύτες	Γραμμικότητα (μg L ⁻¹)	r ²	Επαναληψι- μότητα (RSD %)	Αναπαραγωγι- κότητα (RSD %)	LOD (ng L ⁻¹)	Ανάκτηση (R%) (RSD %)
E6300	1.0-500.0	0.9990	13.1	5.8	320.0	82.7 (1.6)
E9020	0.8-400.0	0.9999	7.1	7.3	250.0	87.2 (2.3)
E4360	0.8-400.0	0.9997	11.4	9.3	250.0	77.5 (2.6)
HMS	0.2-300.0	0.9999	13.0	3.9	60.6	84.5 (9.7)
OD-PABA	0.8-400.0	0.9999	12.3	6.3	250.0	79.4 (0.5)
Octylsalicylate	2.0-500.0	0.9999	3.8	1.2	605.0	82.6 (6.6)

6.1.5.2. Δείγματα Νερού

Μετά τα στάδια βελτιστοποίησης και επικύρωσης, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δυο διαφορετικούς τύπους υδάτων (θαλασσινό και ποτάμιο). Για κάθε υπόστρωμα, η ανάλυση έγινε σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων 25, 50 και 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ και η ανάλυση για κάθε δείγμα επαναλήφθηκε από τρεις φορές. Οι τιμές των ανακτήσεων κυμάνθηκαν σε ικανοποιητικά επίπεδα πάνω από 70% για όλες τις περιπτώσεις. Στον Πίνακα 6.9 φαίνονται τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ_s), οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις ($\text{RSD}\%$) και οι ανακτήσεις ($\text{R}\%$) των αναλυτών για κάθε τύπο νερού σε συγκέντρωση 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Συγκρίνοντας τις ανακτήσεις που προέκυψαν για τους τρεις τύπους νερού (πηγής, θαλασσινό και ποτάμιο) διαπιστώνεται μικρή μείωση αυτών από το νερό πηγής στο θαλασσινό και στη συνέχεια στο ποτάμιο νερό. Η συμπεριφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στην αύξηση της οργανικής ύλης με την ίδια σειρά. Επιπλέον οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις ($\text{RSD}\%$) κυμάνθηκαν από 4.6 έως 11.3% στο θαλασσινό νερό και από 1.6 έως 9.3% νερό του ποταμού.

Πίνακας 6.9: Ανακτήσεις ($\text{R}\%$), οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις ($\text{RSD}\%$) και όρια ποσοτικοποίησης (LOQ_s) στο θαλασσινό και ποτάμιο νερό.

Αναλύτες	Νερό θάλασσας		Νερό ποταμού	
	Ανάκτηση ($\text{R}\%$)	LOQ	Ανάκτηση ($\text{R}\%$)	LOQ
	($\text{RSD}\%$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\text{RSD}\%$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)
E6300	81.5 (7.9)	1.0	80.6 (2.5)	1.0
E9020	85.2 (8.2)	1.1	84.2 (9.3)	1.0
E4360	75.8 (4.6)	0.8	70.2 (7.9)	0.8
HMS	80.8 (7.3)	0.2	78.6 (2.4)	0.2
OD-PABA	77.2 (11.3)	0.8	76.9 (7.2)	0.8
Octylsalicylate	82.1 (10.6)	1.9	80.6 (1.6)	2.0

6.2. Βελτιστοποίηση Της Υγρής Υγρής Μικροεκχύλισης Διασποράς (**DLLME**) Σε Επιφανειακά Ύδατα Για Τις PCMs Και Τους PAEs

6.2.1. Χρωματογραφική Τεχνική

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των PCMs και των PAEs πραγματοποιήθηκε σε Αέριο Χρωματογράφο συζευγμένο με Φασματογράφο Μάζας (GC-MS). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της στήλης που χρησιμοποιήθηκε ήταν: αρχική θερμοκρασία 50°C για 2 min, άνοδος της θερμοκρασίας στους 190°C με ρυθμό ανόδου 20°C min⁻¹, στη συνέχεια άνοδος της θερμοκρασίας στους 270°C με ρυθμό ανόδου 5°C min⁻¹ και παραμονή στην τελική θερμοκρασία για 5min. Η θερμοκρασία της πηγής των ιόντων ρυθμίστηκε στους 280°C και τα φάσματα ελήφθησαν στα 70eV. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου, λαμβάνοντας υπόψη ότι τα αποτελέσματα της ανάλυσης δεν επηρεάζονται από πιθανές διαφοροποιήσεις στην απόκριση, από τον όγκο του δείγματος που εισάγεται στον χρωματογράφο ή την μετατόπιση των χρόνων κατακράτησης. Απαραίτητη προϋπόθεση των παραπάνω είναι η ανάλυση να πραγματοποιείται εντός της περιοχής γραμμικής απόκρισης του ανιχνευτή. Στον Πίνακα 6.10 παρουσιάζονται οι χρόνοι κατακράτησης (t_R) και τα επιλεγμένα ιόντα για κάθε αναλύτη.

Πίνακας 6.10: Χρόνοι κατακράτησης (t_R , min), ιόντα ποσοτικοποίησης και ταυτοποίησης που προσδιορίζονται με τη χρήση GC-MS.

Αναλύτες	t_R (min)	Ιόντα ποσοτικοποίησης (m/z)	Ιόντα ταυτοποίησης (m/z)
ADBI	12.41	229	173, 244
AHMI	12.90	229	187, 244
ATII	14.01	215	173, 258
HHCB	14.13	213	243, 258
AHTN	14.20	149	187, 243, 258
BBP	21.63	206	191
DOP	27.97	279	57

6.2.2. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς (*DLLME*)

5 mL υδατικού δείγματος τοποθετούνται σε γυάλινο φυγοκεντρικό σωλήνα και εμβολιάζονται με το μίγμα των αναλυτών σε συγκέντρωση 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Στη συνέχεια, 0.62 mL μεθανόλης (διαλύτης διασποράς) αναμιγνύονται με 250 $\mu\text{L CCl}_4$ (διαλύτης εκχύλισης) και 12 $\mu\text{L hexamethylbenzene}$ (εσωτερικό πρότυπο) και εμβολιάζονται άμεσα εντός του υδατικού διαλύματος. Το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς, σχηματίζοντας πολλές μικρές σταγόνες (θόλωμα) οι οποίες διασπείρονται σε όλη την επιφάνεια του διαλύματος, με τους αναλύτες να εκχυλίζονται εντός αυτών. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετείται στην φυγόκεντρο για 7.5 min στις 4000 στροφές. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης η καταβυθιζόμενη φάση (CCl_4) συμπυκνώθηκε στα 20 μL με τη βοήθεια αέριου αζώτου και εγχέεται στο GC-MS.

6.2.3. Προκαταρκτικά Πειράματα

Όπως αναφέραμε και στην Ενότητα 6.1.3, τα προκαταρκτικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν με στόχο τον προσδιορισμό του κατάλληλου συνδυασμού διαλυτών εκχύλισης και διασποράς. Οι διαλύτες εκχύλισης και διασποράς που ελέγχθηκαν ήταν: C_2Cl_4 , CCl_4 , $CHCl_3$ και μεθανόλη, ακετόνη, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όταν χρησιμοποιήθηκε C_2Cl_4 ως διαλύτης διασποράς (με όλους τους πιθανούς συνδυασμούς) ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των ουσιών δεν κατέστη δυνατός ενώ αντίθετα στην περίπτωση του $CHCl_3$ δεν σχηματίστηκαν οι προαπαιτούμενες δυο φάσεις. Καταλήγοντας, ο ιδανικότερος συνδυασμός διαλυτών βρέθηκε να είναι ο CCl_4 με τη μεθανόλη (MeOH).

6.2.4. Πολυπαραγοντική Μέθοδος

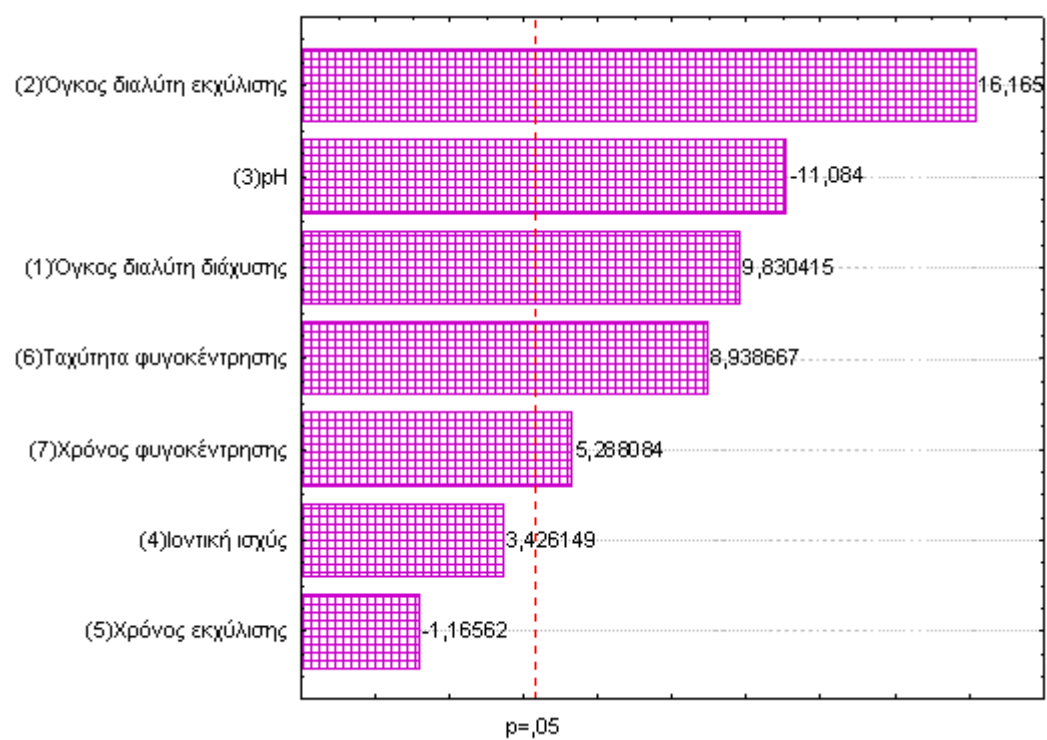
6.2.4.1. Σχεδιασμός Αξιολόγησης Plackett-Burman

Όπως στην περίπτωση των φίλτρων UV έτσι και εδώ, εφαρμόστηκε ο πειραματικός σχεδιασμός αξιολόγησης Plackett–Burman 2^{7-4} . Ο πειραματικός σχεδιασμός αποτελείται από ένδεκα πειράματα με τρία κεντρικά σημεία προκειμένου να εκτιμηθεί το πειραματικό σφάλμα. Σε αυτή την περίπτωση οι παράγοντες που επιλέχθηκαν ήταν: ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης (μL), ο όγκος του διαλύτη διασποράς (mL), το pH, η ιοντική ισχύς (NaCl, w/v %), ο χρόνος εκχύλισης (min), ο χρόνος φυγοκέντρωσης (min) και η ταχύτητα φυγοκέντρωσης (rpm), ενώ ως απόκριση επιλέχθηκε η μέση τιμή των ανακτήσεων των επιλεγμένων ουσιών (R%). Οι παράγοντες, οι κωδικοποιημένες τιμές και τα επίπεδα αυτών παρατίθενται στον Πίνακα 6.11.

Πίνακας 6.11: Οι πειραματικοί παράγοντες, οι κωδικοποιημένες τιμές, τα επίπεδα τιμών τους για τον πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman

Παράγοντες	Κωδικοποιημένες τιμές	Επίπεδα		
		Χαμηλό (-1)	Κεντρικό (0)	Υψηλό (+1)
Όγκος MeOH (mL)	X ₁	0.50	1.25	2.00
Όγκος CCl ₄ (μL)	X ₂	40	120	200
pH	X ₃	3	7	11
Ιοντική ισχύς (NaCl w/v %)	X ₄	0.0	2.5	5.0
Χρόνος εκχύλισης (min)	X ₅	1	2	3
Ταχύτητα φυγοκέντρησης (rpm)	X ₆	1000	2500	4000
Χρόνος φυγοκέντρησης (min)	X ₇	2	6	10

Σειρά	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	-1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1
9	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0



Σχήμα 16: Απεικόνιση του διαγράμματος Pareto για τον 2^{7-4} πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman.

Πίνακας 6.12: Αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για τον 2^{7-4} πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman.

	Επίδραση	Σταθερές	t	p ^a
Αλληλεπίδραση	64.31	64.31	66.35	0.001
X ₁	22.34	11.17	9.83	0.010
X ₂	36.74	18.37	16.16	0.004
X ₃	-25.19	-12.59	-11.08	0.008
X ₄	7.79	3.89	3.43	0.076
X ₅	-2.65	-1.32	-1.17	0.364
X ₆	20.32	10.15	8.94	0.012
X ₇	12.02	6.01	5.29	0.034

* $R^2 = 0.99089$

Από την ανάλυση των δεδομένων (Πίνακας 6.12) διαπιστώνεται ότι οι παράγοντες, όγκος του διαλύτη διασποράς (X₁), όγκος του διαλύτη εκχύλισης (X₂), pH (X₃), ταχύτητα φυγοκέντρωσης (X₆) και χρόνος φυγοκέντρωσης (X₇) επηρεάζουν την απόκριση της μεθόδου, με θετικό και αρνητικό τρόπο ($p < 0.05$). Από τους προαναφερθέντες, ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης, ο όγκος του διαλύτη διασποράς, η ταχύτητα και ο χρόνος φυγοκέντρωσης παρουσιάζουν θετική επίδραση, αυξάνοντας την ανάκτηση της μεθόδου, με τον όγκο του διαλύτη εκχύλισης να είναι ο πιο σημαντικός.

Από το διάγραμμα Pareto (σχήμα 16), το pH εμφανίζεται να είναι ο δεύτερος στατιστικά πιο σημαντικός παράγοντας επηρεάζοντας όμως αρνητικά στην απόκριση, μειώνοντας την ανάκτηση. Η συμπεριφορά αυτή παρατηρείται από το χαμηλό στο υψηλό επίπεδο τιμών. Σε όξινο και ουδέτερο περιβάλλον (pH 3.0 έως 7.0) η διάχυση των ουσιών εντός του υδατικού διαλύματος και η μετέπειτα εκχύλιση

τους ήταν ευκολότερη, οδηγώντας σε καλύτερες τιμές απόδοσης. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, ο παράγοντας pH αποκλείστηκε από το επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας διατηρώντας ουδέτερη την τιμή του στο διάλυμα. Τέλος, η ιοντική ισχύς και ο χρόνος εκχύλισης δεν βρέθηκαν να επηρεάζουν την απόκριση για διάστημα εμπιστοσύνης 95%, αποκλείοντας τους από τον επόμενο πειραματικό σχεδιασμό βελτιστοποίησης. Επομένως, οι παράγοντες που επιλέχθηκαν ήταν: ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης (CCl_4), ο όγκος του διαλύτη διασποράς (MeOH) και ο χρόνος φυγοκέντρωσης. Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι η ταχύτητα φυγοκέντρωσης στο επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας διατηρήθηκε στις μέγιστες στροφές (4000 rpm).

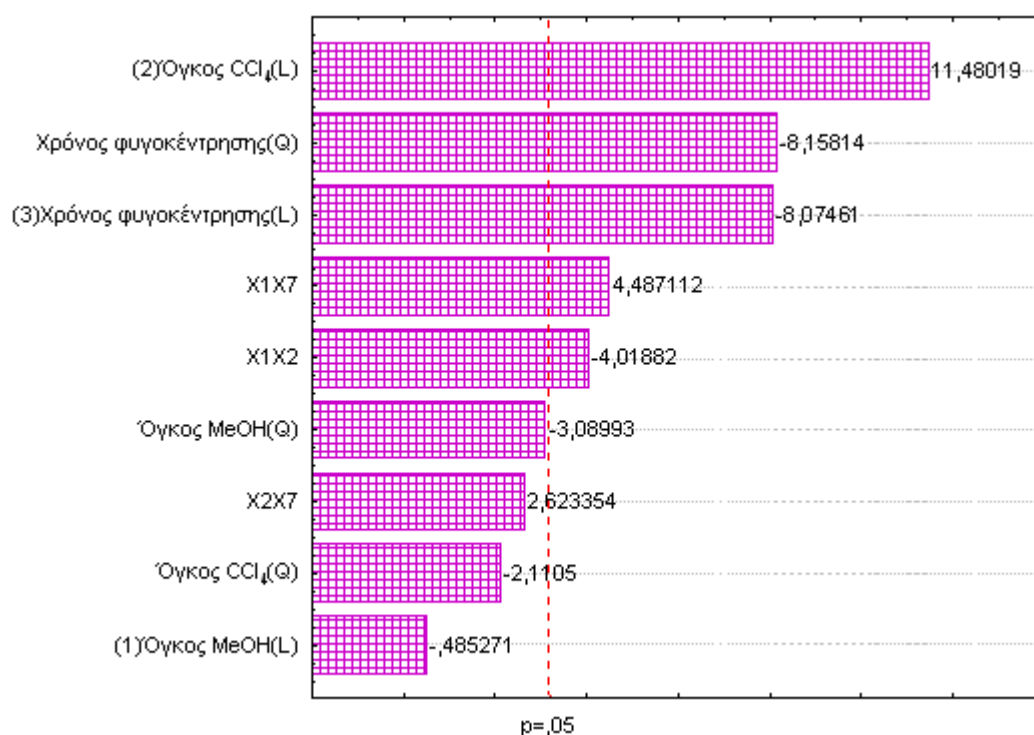
6.2.4.2. Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)

Στον Πίνακα 6.13, παρουσιάζεται αναλυτικά ο πειραματικός σχεδιασμός που εφαρμόστηκε.

Πίνακας 6.13: Σύνολο δεδομένων του Κεντρικού Σύνθετου Σχεδιασμού.

Παράγοντες	Επίπεδα			Κεντρικά σημεία ($\alpha = 1.682$)	
	Χαμηλό (-1)	Κεντρικό (0)	Υψηλό (+1)	- α	+ α
(X_1) Όγκος MeOH (mL)	0.90	1.30	1.70	0.62	1.97
(X_2) Όγκος CCl ₄ (μL)	90	150	210	49	250
(X_7) Χρόνος φυγοκέντρωσης (min)	7.00	9.00	10.80	5.97	12.00
Σειρά	X_1	X_2	X_7	R%	
1	-1	-1	-1	63.25	
2	-1	-1	1	41.74	
3	-1	1	-1	80.21	
4	-1	1	1	59.97	
5	1	-1	-1	67.05	
6	1	-1	1	53.11	
7	1	1	-1	62.77	
8	1	1	1	65.35	
9	-1.682	0	0	68.31	
10	+1.682	0	0	63.91	
11	0	-1.682	0	50.60	
12	0	+1.682	0	85.35	
13	0	0	-1.682	61.91	
14	0	0	+1.682	50.99	
15	0	0	0	69.57	
16	0	0	0	74.64	
17	0	0	0	69.58	
18	0	0	0	70.84	

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 6.14) και το διάγραμμα Pareto (σχήμα 17), που απεικονίζονται παρακάτω, χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία και ερμηνεία των δεδομένων.



Σχήμα 17: Απεικόνιση του διαγράμματος Pareto για το CCD.

Πίνακας 6.14: Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για τον προτεινόμενο πειραματικό σχεδιασμό.

	SS	df	MS	F-τιμή	ρ-τιμή Πιθανότητα > F	Παρατηρήσεις
Μοντέλο	1840.40	9	204.50	35.66	< 0.0001	Σημαντική
X_1	1.35	1	1.35	0.24	0.661	
X_2	755.73	1	755.73	131.79	0.001	
X_7	373.86	1	373.86	65.19	0.004	
X_1^2	54.78	1	54.78	9.55	0.053	
X_2^2	25.54	1	25.54	4.45	0.125	
X_7^2	381.64	1	381.64	66.56	0.004	
X_1X_2	92.61	1	92.61	16.15	0.028	
X_1X_7	115.45	1	115.45	20.13	0.021	
X_2X_7	39.46	1	39.46	6.88	0.079	
LOF	163.36	5	32.67	5.70	0.091	Ασήμαντη
Σφάλμα	17.20	3	5.73			
Συνολικό SS	1952.27	17				

*Συντελεστής προσδιορισμού $R^2 = 0.90751$ και η ρυθμιζόμενη σταθερά προσδιορισμού $R^2 = 0.80347$

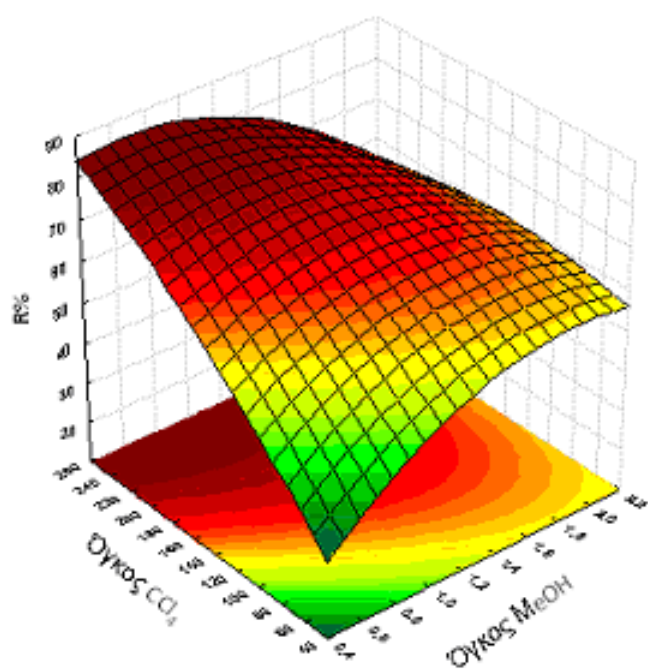
Η ορθότητα του προτεινόμενου μοντέλου ελέγχθηκε περαιτέρω με τη βοήθεια του Πίνακα 6.14. Η τιμή της παραμέτρου F (35.66) σε συνδυασμό με την τιμή $p < 0.0001$ υποδεικνύει ότι το προτεινόμενο μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό [313]. Επιπλέον, η τιμή του LOF δεν ήταν σημαντική με $p > 0.05$, ενώ η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 (0.90751) ήταν αρκετά ικανοποιητική εκφράζοντας ότι το 90.75% της διακύμανσης της απόκρισης μπορεί να ερμηνευτεί από το προτεινόμενο μοντέλο [313]. Από το διάγραμμα Pareto, παρατηρούνται επιδράσεις

πρώτου και δευτέρου βαθμού καθώς και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων. Οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται και επηρεάζουν στατιστικά σημαντικά την απόκριση αναφέρονται στον όγκο της MeOH και τον όγκο του CCl₄ (X₁X₂) καθώς και στον όγκο της MeOH και το χρόνο φυγοκέντρωσης (X₁X₇).

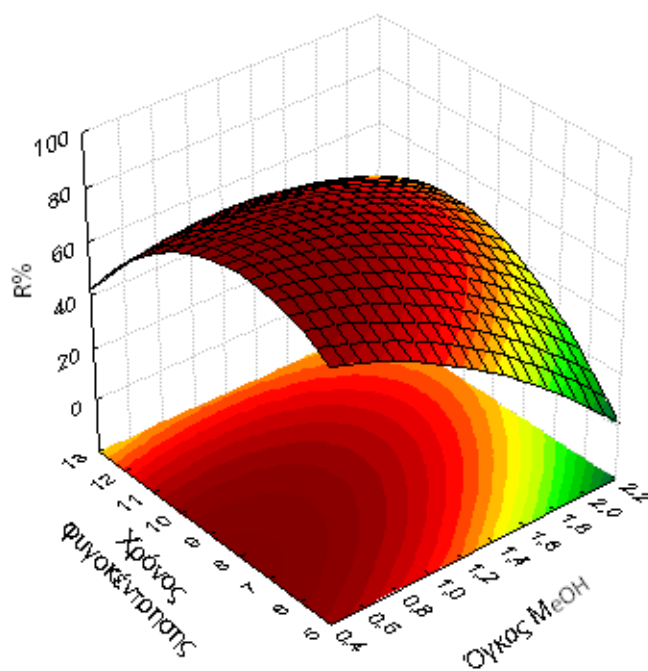
Στο τελικό στάδιο του πειραματικού σχεδιασμού, μια δευτέρου βαθμού πολυωνυμική εξίσωση της ανάκτησης (R%) αναπτύχθηκε για να εκφράσει το προτεινόμενο μοντέλο (εξίσωση 29):

$$R\% = 71.22 + 7.43X_2 - 5.23X_7 - 5.49X_7^2 - 3.40X_1X_2 + 3.80X_1X_7 \quad (29)$$

Επόμενο βήμα είναι ο προσδιορισμός των βέλτιστων τιμών των τριών παραγόντων (X₁, X₂, X₇) για τις οποίες παρατηρείται η μέγιστη ανάκτηση (R%). Στο σχήμα 18 (α και β) απεικονίζονται σε τρισδιάστατη μορφή (3D) οι αλληλεπιδράσεις «όγκος CCl₄ - όγκος MeOH» (σχήμα 18α) και «χρόνος φυγοκέντρωσης - όγκος MeOH» (σχήμα 18β). Σε κάθε περίπτωση περιγράφεται η αλληλεπίδραση των δυο παραγόντων διατηρώντας τον τρίτο σταθερό στο μηδενικό επίπεδο, ενώ ο κάθετος άξονας εκφράζει την ανάκτηση της μεθόδου (R%).



(α)



(β)

Σχήμα 18: Τρισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που επηρεάζουν την απόκριση της μεθόδου (α) «όγκος CCl_4 - όγκος MeOH » και (β) «χρόνος φυγοκέντρωσης - όγκος MeOH »

Παρατηρώντας το σχήμα 18α, διαπιστώνουμε ότι όταν χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα μικροί όγκοι από τους διαλύτες εκχύλισης (CCl_4) και διασποράς (MeOH) η απόδοση της εκχύλισης, εκφραζόμενη ως ανάκτηση (R%), είναι χαμηλή (~35%). Η συμπεριφορά αυτή οφείλεται στο ότι ο μικρός όγκος του διαλύτη διασποράς (MeOH) δεν επαρκεί ώστε να διασπείρει κατάλληλα τον διαλύτη εκχύλισης εντός του υδατικού διαλύματος [177]. Αυξάνοντας σταδιακά τον διαλύτη διασποράς χρησιμοποιώντας μικρό όγκο διαλύτη εκχύλισης (40-70 μL), η ανάκτησης (R%) αυξάνεται φθάνοντας σε μια μέγιστη τιμή και στη συνέχεια σταθεροποιείται. Περαιτέρω αύξηση του όγκου του CCl_4 (> 100 μL) προκαλεί μείωση της ανάκτησης, λόγω αύξησης της διαλυτότητας των αναλυτών. Στο σχήμα 18α, η μέγιστη ανάκτηση ($R \approx 86\%$) παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε μικρός όγκος MeOH (0.4–0.8 mL) και μεγάλος όγκος CCl_4 (200–250 μL).

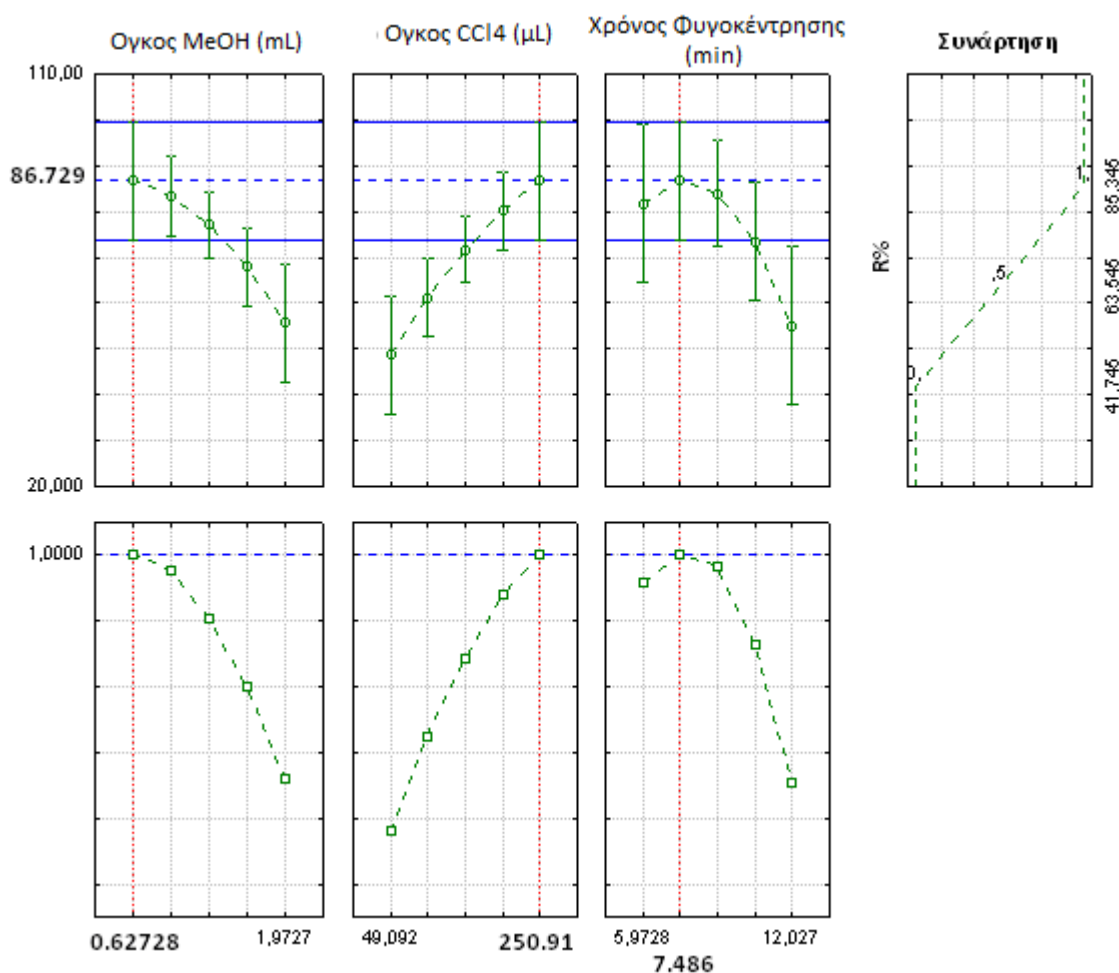
Στο σχήμα 18β, απεικονίζεται η αλληλεπίδραση ανάμεσα στον όγκο της MeOH και τον χρόνο φυγοκέντρησης. Παρατηρώντας το σχήμα, διαπιστώθηκε ότι όταν ο όγκος της MeOH βρέθηκε σε υψηλά επίπεδα τιμών, ανεξάρτητα από τον χρόνο φυγοκέντρησης, η τιμή της ανάκτησης κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα. Η προαναφερθείσα παρατήρηση, πιθανόν να οφείλεται σε αύξηση της διαλυτότητας των αναλυτών εντός του υδατικού διαλύματος. Στην περίπτωση, όπου τόσο ο όγκος της MeOH όσο και ο χρόνος φυγοκέντρησης βρέθηκαν σε χαμηλά επίπεδα τιμών, (0.4-0.7 mL) και (7-9 min) αντίστοιχα, διαπιστώθηκε μέτρια τιμή ανάκτησης (~ 59%). Ο ακριβής προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών πραγματοποιήθηκε με το συνδυασμό των παραπάνω αποτελεσμάτων και της επιθυμητής συνάρτησης.

6.2.4.3. Βελτιστοποίηση Με Τη Μέθοδο Της Επιθυμητής Συνάρτησης (Desirability Function)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από το CCD (Πίνακας 6.13), η μέγιστη και ελάχιστη ανάκτηση (R%) που παρατηρήθηκε ήταν 85.4% και 41.7%, αντίστοιχα. Στο σχήμα 19, παρατηρούνται οι κωδικοποιημένες τιμές 1, 0.5 και 0.0 οι οποίες

εκφράζουν τη μέγιστη (85.4%), ενδιάμεση (63.5%) και ελάχιστη (41.7%) ανάκτηση, αντίστοιχα.

Με βάση τους υπολογισμούς που πραγματοποιήθηκαν από το πρόγραμμα, η μέγιστη ανάκτηση (R%) της μεθόδου υπολογίστηκε στο 86.7 %, με τις βέλτιστες τιμές για κάθε παράμετρο να είναι 0.62 mL MeOH, 250 μ L CCl₄ και 7.5 min ο χρόνος φυγοκέντρησης (σχήμα 19). Για να επαληθευτούν οι παραπάνω τιμές πραγματοποιήθηκαν επαναληπτικά πειράματα με τις βέλτιστες συνθήκες. Οι τιμές των ανακτήσεων που ελήφθησαν ήταν αρκετά κοντά με την μέγιστη ανάκτηση από το πρόγραμμα.

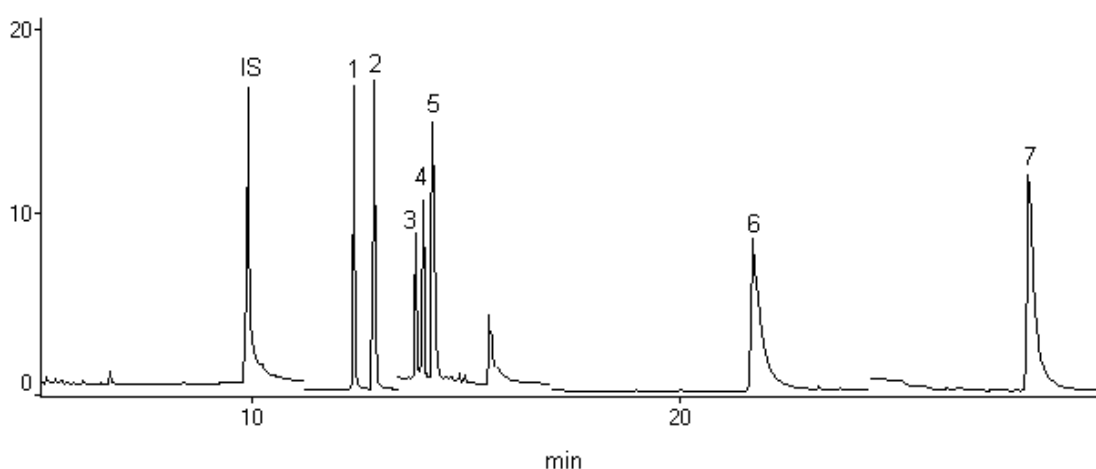


Σχήμα 19: Οι προβλεπόμενες τιμές για τις PCMs και PAEs.

6.2.5. Επικύρωση Της **DLLME** Μεθόδου

6.2.5.1. Γραμμικότητα, Πιστότητα Και Ευαισθησία Της Μεθόδου

Η επικύρωση της **DLLME** μεθόδου ελέγχθηκε σε νερό πηγής εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν (Ενότητα 6.2.4.3), σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g L}^{-1}$ μίγματος PCMs και PAEs. Στο σχήμα 20 φαίνεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος με το μίγμα των επιλεγμένων αναλυτών σε συγκέντρωση $10 \mu\text{g L}^{-1}$.



Σχήμα 20: Χρωματογράφημα GC-MS ύστερα από εκχύλιση με την μέθοδο **DLLME** των επιλεγμένων PCMs και PAEs σε συγκέντρωση $10 \mu\text{g L}^{-1}$: (IS) εσωτερικό πρότυπο, (1) ADBI, (2) AHMI, (3) ATII, (4) HHCB, (5) AHTN, (6) BBP, (7) DOP.

Η γραμμικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με τον υπολογισμό των σταθερών προσδιορισμού r^2 . Το εύρος γραμμικότητας των αναλυτών κυμάνθηκε μεταξύ 0.25 έως $50 \mu\text{g L}^{-1}$ για όλους τους αναλύτες, με σταθερές προσδιορισμού μεγαλύτερες ή ίσες με 0.9970 . Η πιστότητα της μεθόδου, προσδιορίσθηκε με επανάληψη των αναλύσεων στο σύστημα χρωματογραφίας σε τρεις διαδοχικές ημέρες ($n=5 \times 3$ μέρες) εμβολιασμένου δείγματος, με γνωστή τη συγκέντρωση του μίγματος των αναλυτών ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) ενώ η ημερήσια πιστότητα προσδιορίσθηκε με επανάληψη των αναλύσεων την ίδια ημέρα ($n=15$ δείγματα) για την ίδια συγκέντρωση μίγματος. Οι

σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) δεν ξεπέρασαν το 12.2 και 9.7% αντίστοιχα. Υπολογίστηκαν επίσης τα όρια ανίχνευσης (LOD_s) και ποσοτικοποίησης (LOQ_s) της προτεινόμενης μεθόδου. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου κυμάνθηκαν από 8 έως 63 $ng\ L^{-1}$ για όλους τους αναλύτες. Όλα τα δεδομένα επικύρωσης της μεθόδου παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.15.

Πίνακας 6.15: Γραμμικότητα, πιστότητα, όρια ανίχνευσης (LOD_s) και ανακτήσεις (R%) σε νερό πηγής με τη μέθοδο DLLME για τις PCMs και τους PAEs.

Αναλύτες	Γραμμικότητα ($\mu g\ L^{-1}$)	r^2	Επαναληψι- μότητα (RSD %)	Αναπαράγω- γικότητα (RSD %)	LOD ($ng\ L^{-1}$)	Ανάκτηση (R%) (RSD %)
ADBI	0.25-50.00	0.9986	5.8	5.7	31	89.4 (10.6)
AHMI	0.25-50.00	0.9992	8.0	6.4	28	89.9 (9.4)
ATII	0.25-50.00	0.9971	6.8	9.5	63	93.5 (11.9)
HHCB	0.25-50.00	0.9972	8.4	12.2	53	98.4 (10.9)
AHTN	0.25-50.00	0.9984	2.6	9.2	49	87.7 (14.6)
BBP	0.25-50.00	0.9970	9.7	12.1	16	74.0 (9.3)
DOP	0.25-50.00	0.9983	8.3	9.4	8	69.4 (5.5)

6.2.5.2. Δείγματα Νερού

Μετά τα στάδια βελτιστοποίησης και επικύρωσης της προτεινόμενης μεθόδου, εφαρμόστηκε σε τρεις διαφορετικούς τύπους υδάτων (θαλασσινό, ποτάμιο και λιμναίο). Για κάθε υπόστρωμα, η ανάλυση έγινε σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων 25, 50 και 100 $\mu g\ L^{-1}$ και η ανάλυση για κάθε δείγμα επαναλήφθηκε από τρεις φορές. Στον Πίνακα 6.16 φαίνονται τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ_s), οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) και οι ανακτήσεις (R%) των αναλυτών για κάθε

τύπο νερού σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Συγκρίνοντας τις ανακτήσεις που προέκυψαν για τους τέσσερις τύπους νερού διαπιστώνεται μικρή μείωση από το νερό πηγής στο θαλασσινό, στο ποτάμιο και τέλος στο λιμναίο. Η συμπεριφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στην αύξηση της οργανικής ύλης με την ίδια σειρά. Επιπλέον οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) κυμάνθηκαν από 4.6 έως 11.3% στο θαλασσινό νερό και από 1.6 έως 9.3% νερό του ποταμού.

Πίνακας 6.16: Ανακτήσεις (R%), οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) και όρια ποσοτικοποίησης (LOQ_s) στο θαλασσινό, το ποτάμιο και το λιμναίο νερό, σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g L}^{-1}$.

Αναλύτες	Θαλασσινό νερό		Ποτάμιο νερό		Λιμναίο νερό	
	Ανάκτηση %	LOQ	Ανάκτηση %	LOQ	Ανάκτηση % ^a	LOQ
	(RSD %)	(ng L ⁻¹)	(RSD %)	(ng L ⁻¹)	(RSD %)	(ng L ⁻¹)
ADBI	87.4 (5.2)	97.4	86.4 (8.4)	105.1	82.4 (11.1)	108.8
AHMI	85.3 (3.1)	90.0	79.0 (8.5)	94.5	77.4 (11.8)	97.6
ATII	87.5 (2.6)	200.3	83.6 (12)	211.5	79.4 (6.6)	227.0
HHCB	92.9 (2.1)	166.2	89.1 (11.1)	172.2	84.1 (6.7)	188.0
AHTN	85.1 (3.7)	154.4	81.1 (13.3)	155.0	80.8 (10.6)	155.4
BBP	69.8 (3.4)	49.2	67.1 (7.9)	50.0	65.1 (8.9)	55.3
DOP	65.2 (3.8)	24.4	61.1 (8.4)	24.7	60.3 (13.8)	24.9

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ
ΤΗΣ DLLME ΣΕ ΣΤΕΡΕΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (ΕΔΑΦΗ) ΓΙΑ
ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ
ΦΙΛΤΡΩΝ UV, PCM_s ΚΑΙ ΡΑΕ_s ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ
ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ.**

7.1. Βελτιστοποίηση Της Υγρής Υγρής Μικροεκχύλισης Διασποράς (**DLLME**) Σε Στερεό Υπόστρωμα Για Τα Φίλτρα UV

7.1.1. Χρωματογραφική Τεχνική

Η χρωματογραφική τεχνική που ακολουθήθηκε σε αυτή την περίπτωση είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας HPLC-UV/DAD. Στο Κεφάλαιο 6, ενότητα 6.1.1 αναφέρεται λεπτομερώς το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε και οι χρόνοι κατακράτησης των ουσιών.

Η ποσοτικοποίηση των αναλυτών έγινε με τη χρήση καμπύλης αναφοράς 7 σημείων, από πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης στον διαλύτη εκχύλισης σε συνάρτηση με τα εμβαδά των κορυφών των αντίστοιχων αναλυτών. Στον Πίνακα 7.1 παρουσιάζονται οι παράμετροι της γραμμικότητας του οργάνου για κάθε ένα αναλύτη.

Πίνακας 7.1: Παράμετροι γραμμικότητας του οργάνου.

	E4360	E6300	OD-PABA	Octylsalicylate	EHMS
Εύρος (mg L^{-1})	0.1-10.0	0.1-10.0	0.5-10.0	0.1-10.0	0.1-10.0
Σημείο τομής (α)	220887	167163	191320	23375	58116
Κλίση (β)	44749	-6512.4	-24047	-3211.7	-9599.4
Συντελεστής συσχέτισης (r)	0.9993	0.9992	0.9996	0.9996	0.9976
Συντελεστής προσδιορισμού (r^2)	0.9986	0.9984	0.9991	0.9992	0.9952

7.1.2. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς (**DLLME**) Σε Στερεό Υπόστρωμα

Η διαδικασία εμβολιασμού και εκχύλισης των φίλτρων UV από δείγματα εδάφους με τη **DLLME** μέθοδο είχε ως εξής:

Αρχικά κατάλληλη ποσότητα μίγματος φίλτρων UV προστέθηκε σε 5 mL ακετόνης (τελική συγκέντρωση $25 \mu\text{g Kg}^{-1}$) και εμβολιάστηκε σε 0.579 gr δείγματος εδάφους. Τα εμβολιασμένα δείγματα ομογενοποιήθηκαν με ανάδευση και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h μέχρι πλήρους εξατμίσεως του διαλύτη. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές διπλές εκπλύσεις των δειγμάτων με 4 mL CH_3CN τοποθετώντας τα σε λουτρό υπερήχων (ισχύς 110W) για 20 min. Οι εκπλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τον διαλύτη διασποράς που είχε επιλεγεί στο Κεφάλαιο 6, ενότητα 6.1.3. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην φυγόκεντρο στις 5000 rpm για 10 min. Τα υπερκείμενα διαλύματα συνενώθηκαν σε φυγοκεντρικό σωλήνα και συμπυκνώθηκαν στα 2.07 mL CH_3CN (σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν από Κεφάλαιο 6, ενότητα 6.1.4.3) με τη βοήθεια αέριου αζώτου. Μετά το τέλος της διεργασίας, τα δείγματα CH_3CN ήταν έτοιμα για την εκχύλιση με τη **DLLME** μέθοδο (Κεφάλαιο 6, ενότητα 6.1.2).

7.1.3. Πολυπαραγοντική Μέθοδος

Τα χώματα ως σύνθετα υποστρώματα που είναι, υπόκεινται σε συστηματικές επιδράσεις περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο υπόστρωμα [314]. Γι αυτό το λόγο, η πολύπαραγοντική μέθοδος που εφαρμόστηκε σε αυτά τα δείγματα, αποσκοπούσε στην βελτιστοποίηση επιλεγμένων παραγόντων. Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν ήταν: η ποσότητα του χώματος (gr), ο όγκος του CH_3CN (mL) που χρησιμοποιήθηκε για τις εκπλύσεις των χωμάτων, ο αριθμός των εκπλύσεων, η θερμοκρασία ($^{\circ}\text{C}$) και ο χρόνος παραμονής του δείγματος στους υπερήχους (min).

Για τον προσδιορισμό της ανάκτησης χρησιμοποιήθηκε ένας κλασματικός πειραματικός σχεδιασμός δυο σταδίων. Αρχικά εφαρμόστηκε ο πειραματικός

σχεδιασμός αξιολόγησης (Plackett-Burman) ώστε να προσδιοριστούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόκριση και στη συνέχεια ένας σχεδιασμός βελτιστοποίησης (Central Composite Design (CCD)).

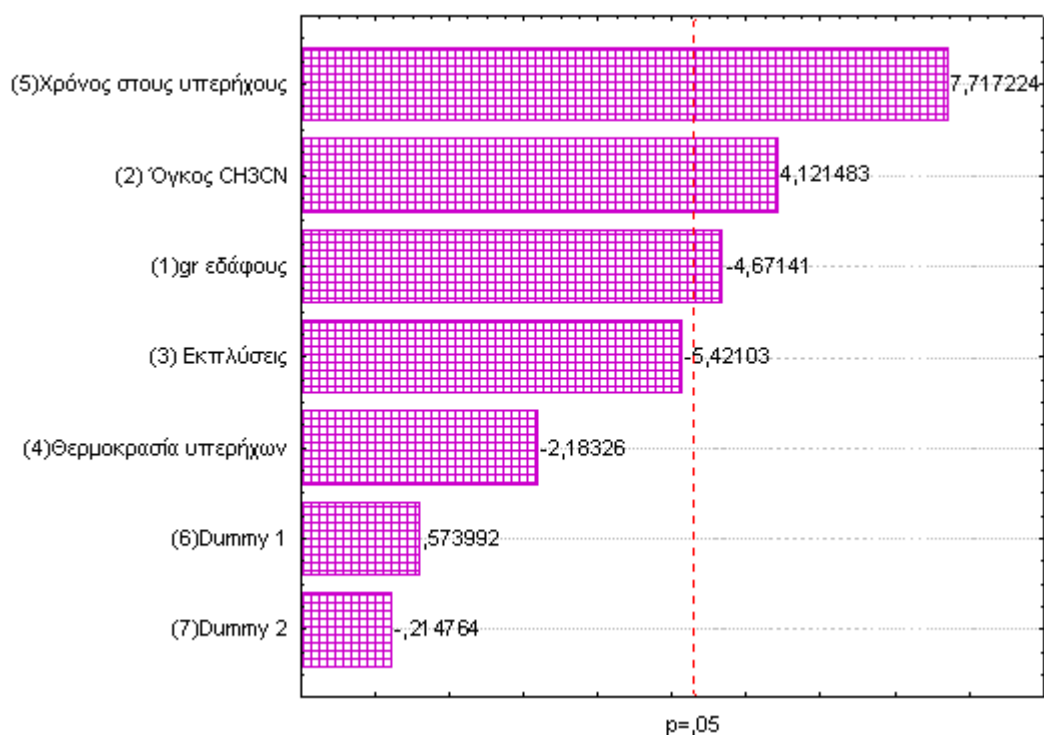
7.1.3.1. Σχεδιασμός Αξιολόγησης Plackett-Burman

Ένας 2^{7-4} πειραματικός σχεδιασμός εφαρμόστηκε ώστε να προσδιοριστούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόκριση της μεθόδου. Κάθε παράγοντας εξετάστηκε σε δυο επίπεδα: (-1) το χαμηλότερο και (+1) το υψηλότερο. Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν ήταν: (1) η ποσότητα του χώματος (gr), (2) ο όγκος του CH_3CN (mL) που χρησιμοποιήθηκε για τις εκπλύσεις των χωμάτων, (3) ο αριθμός των εκπλύσεων, (4) ο χρόνος παραμονής του δείγματος στο λουτρό υπερήχων (min) και (5) η θερμοκρασία των υπερήχων ($^{\circ}\text{C}$). Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, όπου οι επιλεγμένοι παράγοντες είναι 5, ο πειραματικός σχεδιασμός συμπληρώθηκε χρησιμοποιώντας τις ψευτομεταβλητές (*dummy*) (Κεφάλαιο 3, Ενότητα 3.6.2). Συνολικά πραγματοποιήθηκαν ένδεκα πειράματα, με πέντε παράγοντες, δυο ψευτομεταβλητές (*dummy*) και τρία κεντρικά σημεία. Ως μετρήσιμη απόκριση χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή των ανακτήσεων των αναλυτών για κάθε σειρά πειραμάτων (R%). Οι παράγοντες, οι κωδικοποιημένες τιμές, τα επίπεδα τιμών παρατίθενται στον Πίνακα 7.2.

Πίνακας 7.2: Οι πειραματικοί παράγοντες, οι κωδικοποιημένες τιμές, τα επίπεδα τιμών τους για τον πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman

Παράγοντες	Κωδικοποιημέ- νες τιμές	Επίπεδα		
		Χαμηλό (-1)	Κεντρικό (0)	Υψηλό (+1)
Έδαφος (gr)	S ₁	0.50	1.25	2.00
Όγκος CH ₃ CN (mL)	S ₂	1	3	5
Εκπλύσεις	S ₃	1	2	3
Θερμοκρασία Υπερήχων (°C)	S ₄	0	25	50
Χρόνος παραμονής υπερήχους (min)	S ₅	10	20	30
Dummy 1	S ₆	-1	0	1
Dummy 2	S ₇	-1	0	1

Σειρά	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	-1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1
9	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0



Σχήμα 21: Απεικόνιση του διαγράμματος Pareto για τον 2^{7-4} πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman.

Πίνακας 7.3. Αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για το 2^{7-4} πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman.

	Επίδραση	Σταθερές	t	p
Αλληλεπίδραση	65.75	65.74	71.38	0.0001
S_1	-13.75	-6.88	-6.37	0.024
S_2	12.13	6.07	4.13	0.032
S_3	-15.96	-7.97	-5.42	0.054
S_4	-6.43	-3.21	-2.98	0.096
S_5	22.71	11.36	10.52	0.009

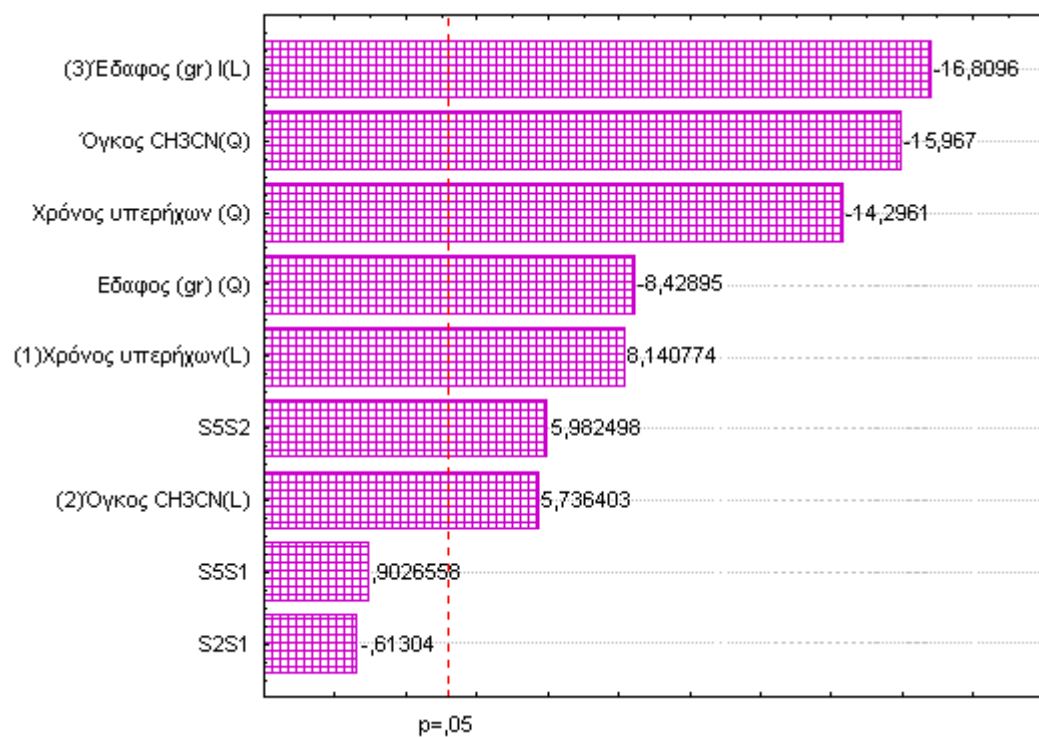
Στη συνέχεια βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 7.3) και το διάγραμμα Pareto (Pareto-chart) (σχήμα 21) για το εκτιμώμενο μοντέλο, προσδιορίσθηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Από αυτούς, ο χρόνος παραμονής του δείγματος στο λουτρό υπερήχων (min) (S_5) και ο όγκος του CH_3CN (mL) (S_2) βρέθηκαν να επηρεάζουν θετικά την απόκριση ενώ η ποσότητα του εδάφους (gr) (S_1) αρνητικά.

7.1.3.2. Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)

Επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας ήταν η βελτιστοποίηση των επιπέδων των επιλεγμένων παραγόντων με στόχο την επίτευξη υψηλών ανακτήσεων (R%). Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν ήταν: (1) ο χρόνος παραμονής στους υπερήχους (min) (S_5), (2) ο όγκος του CH_3CN (mL) (S_2) και (3) η ποσότητα του εδάφους (gr) (S_1). Η θερμοκρασία στους υπερήχους (S_4) διατηρήθηκε στους 35°C ώστε να αποφευχθεί η θερμική διάσπαση των ουσιών ενώ για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν από δυο εκπλύσεις (S_3). Όπως διαπιστώνεται από το διάγραμμα Pareto (σχήμα 21), η αύξηση του αριθμού των εκπλύσεων (παράγοντας S_3) επηρεάζει αρνητικά την ανάκτηση της μεθόδου από το χαμηλό στο υψηλό επίπεδο τιμών. Είναι πιθανό, καθώς αυξάνεται ο αριθμός των εκπλύσεων στο δείγμα, να αυξάνεται και η συγκέντρωση των ουσιών που δρουν ανταγωνιστικά παρεμποδίζοντας την εκχύλιση των επιλεγμένων ουσιών.

Πίνακας 7.4: Σύνολο δεδομένων του Κεντρικού Σύνθετου Σχεδίου (CCD).

Παράγοντες	Επίπεδα			Αξονικά σημεία ($\alpha = 1.682$)	
	Χαμηλό (-1)	Κεντρικό (0)	Υψηλό (+1)	- α	+ α
(S ₅) Χρόνος παραμονής στους υπερήχους (min)	10.00	20.00	30.00	3.18	36.81
(S ₂) Όγκος CH ₃ CN (mL)	3.00	4.00	5.00	2.31	5.68
(S ₁) Έδαφος (gr)	0.50	1.00	1.50	0.15	1.84
Σειρά	S ₅	S ₂	S ₁	R%	
1	-1	-1	-1	54.0	
2	-1	-1	1	40.0	
3	-1	1	-1	51.9	
4	-1	1	1	34.7	
5	1	-1	-1	53.3	
6	1	-1	1	39.8	
7	1	1	-1	64.0	
8	1	1	1	50.7	
9	- α	0	0	43.5	
10	+ α	0	0	58.1	
11	0	- α	0	42.0	
12	0	+ α	0	55.1	
13	0	0	- α	73.0	
14	0	0	+ α	44.5	
15	0	0	0	70.0	
16	0	0	0	69.1	
17	0	0	0	68.1	
18	0	0	0	66.0	



Σχήμα 22: Απεικόνιση του διαγράμματος Pareto για το CCD.

Πίνακας 7.5: Αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για τον προτεινόμενο πειραματικό σχεδιασμό.

	SS	df	MS	F-τιμή	ρ-τιμή Πιθανότητα > F	Παρατηρήσεις
Μοντέλο	2768.19	9	307.58	105.45	<0.0001	Σημαντική
S_5	193.29	1	193.29	66.27	0.004	
S_2	95.98	1	95.98	32.91	0.001	
S_1	824.14	1	824.14	282.56	0.011	
S_5^2	596.10	1	596.10	204.38	0.001	
S_2^2	743.59	1	743.59	254.95	0.001	
S_1^2	207.22	1	207.22	71.05	0.003	
S_5S_2	104.38	1	104.38	35.79	0.009	
S_5S_1	2.37	1	2.37	0.81	0.433	
S_2S_1	1.09	1	1.09	0.37	0.583	
LOF	55.35	5	11.07	3.79	0.151	Ασήμαντη
Σφάλμα	8.75	3	2.92			
Συνολικό SS	2426.84	17				

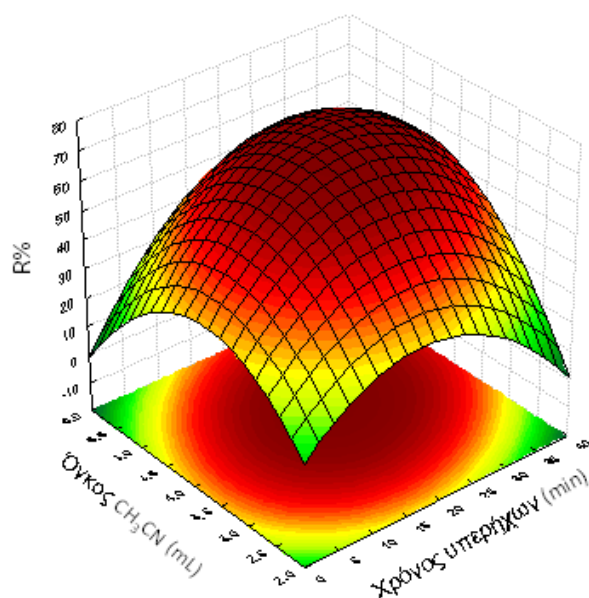
Τα αποτελέσματα από την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 7.5) και το διάγραμμα Pareto (σχήμα 22) χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία και ερμηνεία των δεδομένων. Η τιμή του LOF δεν βρέθηκε να είναι σημαντική ($p > 0.05$), ενώ αρκετά ικανοποιητική ήταν η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 (0.97359), εκφράζοντας ότι το 97.36 % της διακύμανσης της απόκρισης μπορεί να ερμηνευτεί από το προτεινόμενο μοντέλο. Από το διάγραμμα Pareto διαπιστώθηκαν επιδράσεις πρώτου S_5 , S_2 , S_1 και δευτέρου βαθμού S_5^2 , S_2^2 , S_1^2 καθώς και η αλληλεπίδραση ανάμεσα στον χρόνο παραμονής του δείγματος στο λουτρό υπερήχων και τον

χρησιμοποιούμενο όγκο του CH₃CN (S₅S₂). Στο τελικό στάδιο του πειραματικού σχεδιασμού, μια δευτέρου βαθμού πολυωνυμική εξίσωση της ανάκτησης (R%) αναπτύχθηκε για να εκφράσει το προτεινόμενο μοντέλο (εξίσωση 30):

$$R\% = 68.40 + 3.76S_5 + 2.65S_2 - 7.77S_1 - 6.86S_5^2 - 7.67S_2^2 - 4.05S_1^2 + 3.61S_5S_2 \quad (30)$$

όπου: S₁ είναι ο παράγοντας έδαφος, S₂ ο όγκος του CH₃CN και S₅ ο χρόνος παραμονής του δείγματος στο λουτρό υπερήχων.

Σύμφωνα με την εξίσωση 30, οι παράγοντες S₂ και S₅ επηρεάζουν θετικά την ανάκτηση (R%) της μεθόδου ενώ ο παράγοντας S₁ αρνητικά. Πρακτικά, αυτό σημαίνει ότι αυξάνοντας τις τιμές των S₅ και S₂ παρατηρείται αύξηση της ανάκτησης (R%) ενώ η αντίστοιχη αύξηση της τιμής του παράγοντα S₁ προκαλεί μείωση. Στο σχήμα 23 απεικονίζεται σε τρισδιάστατη μορφή η αλληλεπίδραση «Χρόνος υπερήχων – όγκος CH₃CN (S₅S₂)».



Σχήμα 23: Τρισδιάστατη απεικόνιση της αλληλεπίδρασης «Χρόνος υπερήχων – όγκος CH₃CN»

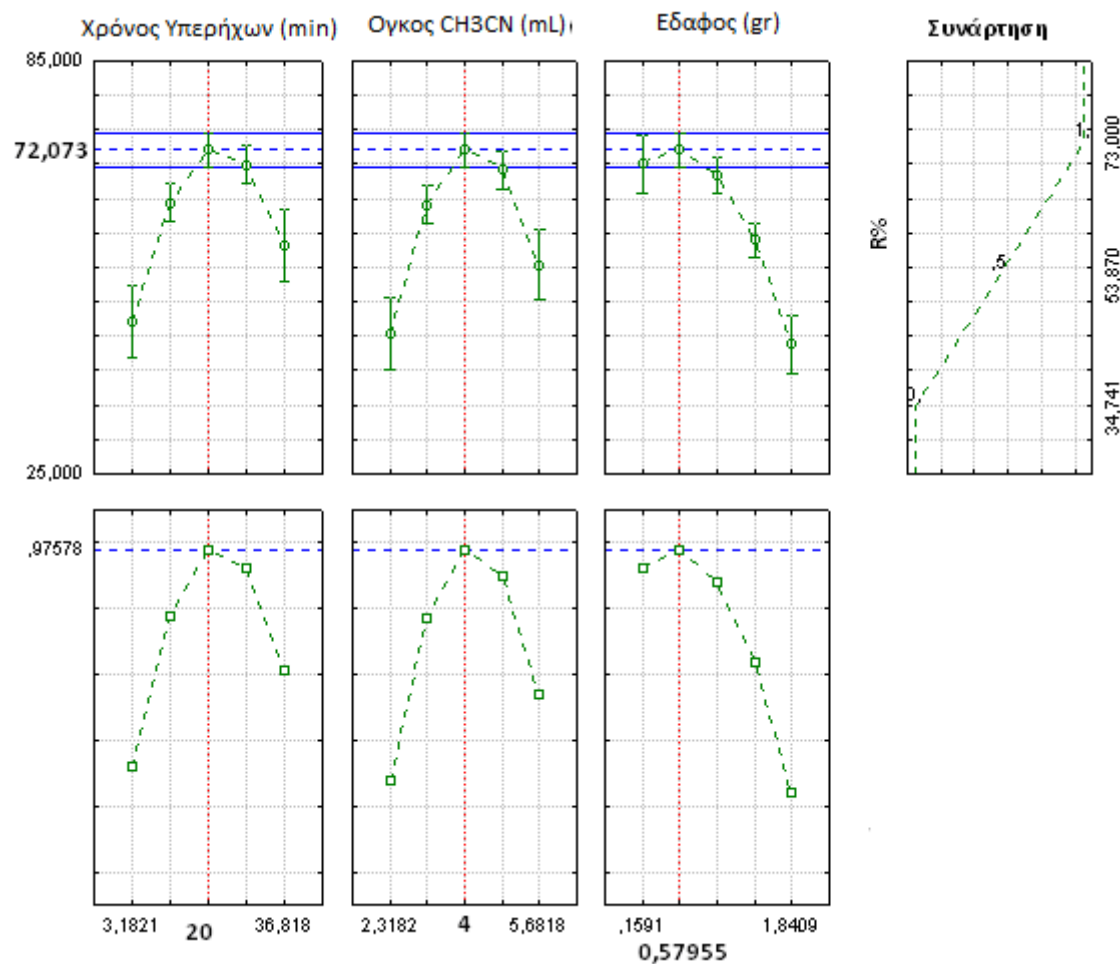
Από το σχήμα 23, παρατηρούμε ότι για μικρό ή μεγάλο όγκο CH_3CN (2 με 6 mL) διατηρώντας παράλληλα τον χρόνο παραμονής του δείγματος στο λουτρό υπερήχων σε χαμηλά επίπεδα (3.5-4 min), η ανάκτηση ήταν πολύ χαμηλή (~ 15%). Όμοιο συμπέρασμα εξήχθη όταν το δείγμα παρέμεινε στο λουτρό υπερήχων για μεγάλο χρονικό διάστημα (35-40 min) χρησιμοποιώντας μικρό όγκο CH_3CN (2 mL). Αντίθετα υψηλή ανάκτηση (~ 70 %) παρατηρήθηκε όταν ο όγκος του CH_3CN ήταν στα 4-4.5 mL και ο χρόνος παραμονής στους υπερήχους 20-25 min. Είναι πιθανόν, σε αυτή την περίπτωση ο χρόνος που χρησιμοποιήθηκε να ήταν αρκετός ώστε να εκχυλιστούν επιτυχώς οι αναλύτες δίχως να συμπαρασυρθούν ουσίες που θα παρεμπόδιζαν την ανάκτηση της μεθόδου.

7.1.3.3. Βελτιστοποίηση Με Τη Μέθοδο Της Επιθυμητής Συνάρτησης (Desirability Function)

Για να πραγματοποιηθεί η βελτιστοποίηση των παραγόντων με τη μέθοδο της επιθυμητής συνάρτησης, λήφθηκαν υπόψη τα αποτελέσματα από τον CCD σχεδιασμό. Στο σχήμα 24, παρατηρούνται οι κωδικοποιημένες τιμές 1, 0.5 και 0.0 που εκφράζουν τη μέγιστη (73.00%), ενδιάμεση (53.87%) και ελάχιστη (34.74%) ανάκτηση, αντίστοιχα. Με βάση τους υπολογισμούς που πραγματοποιήθηκαν από το πρόγραμμα, η μέγιστη ανάκτηση (R%) της μεθόδου υπολογίστηκε στο 72.03 %, με τις βέλτιστες τιμές για κάθε παράμετρο να είναι: χρόνος παραμονής του δείγματος στο λουτρό υπερήχων 20 min, όγκος του CH_3CN 4 mL και η ποσότητα του εδάφους 0.58 gr. Η επαλήθευση των παραπάνω τιμών, πραγματοποιήθηκε για τις βέλτιστες συνθήκες με επαναληπτικά πειράματα. Οι τιμές των ανακτήσεων που ελήφθησαν ήταν αρκετά κοντά με την μέγιστη ανάκτηση που υπολογίστηκε από το μαθηματικό μοντέλο.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε ότι οι χαμηλές ανακτήσεις που παρατηρήθηκαν στα δείγματα εδάφους συγκριτικά με αυτές των δειγμάτων νερού

(Κεφάλαιο 6, ενότητα 6.1.5) πιθανόν να οφείλονται στα συστατικά του εδάφους τα οποία παρεμποδίζουν την εκχύλιση των αναλυτών μειώνοντας τις ανακτήσεις [314].

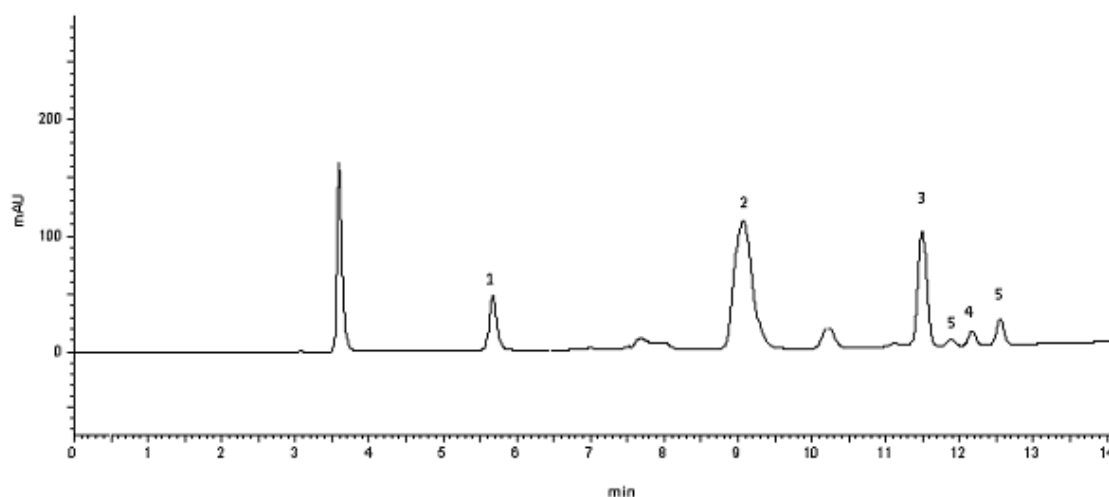


Σχήμα 24: Οι προβλεπόμενες τιμές για τα φίλτρα UV σε δείγματα εδάφους.

7.1.4. Επικύρωση Της **DLLME** Μεθόδου Σε Στερεό Υπόστρωμα

7.1.4.1. Γραμμικότητα, Πιστότητα Και Ευαισθησία Της Μεθόδου

Η μέθοδος επικυρώθηκε σε δείγματα εδάφους από την περιοχή της Ηπείρου εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν από την ενότητα 7.1.3.1. Στο σχήμα 25 φαίνεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος στα 300 nm με το μίγμα των επιλεγμένων αναλυτών σε συγκέντρωση $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$.



Σχήμα 25: Χρωματογράφημα HPLC/UV-DAD ύστερα από εκχύλιση με την μέθοδο **DLLME** των επιλεγμένων φίλτρων UV σε συγκέντρωση $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ σε στερεό υπόστρωμα: (1) E4360, (2) E6300, (3) OD-PABA, (4) Octylsalicylate, (5) HMS.

Η γραμμικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με τον υπολογισμό των σταθερών προσδιορισμού r^2 . Το εύρος γραμμικότητας των αναλυτών κυμάνθηκε από 1 έως $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$, με σταθερές προσδιορισμού μεγαλύτερες ή ίσες με 0.9969. Η πιστότητα (αναπαραγωγικότητα) της μεθόδου, προσδιορίσθηκε με επανάληψη των αναλύσεων στο σύστημα χρωματογραφίας σε τρεις διαδοχικές ημέρες ($n=5 \times 3$ μέρες) εμβολιασμένου δείγματος με γνωστή συγκέντρωση του μίγματος των αναλυτών, ενώ η ημερήσια πιστότητα προσδιορίσθηκε με επανάληψη των αναλύσεων την ίδια ημέρα ($n=15$ δείγματα) για την ίδια συγκέντρωση μίγματος. Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) δεν ξεπέρασαν το 11.0%, και 12.0% αντίστοιχα. Οι ανακτήσεις (R%) κυμάνθηκαν από 65.1 έως 77.9%, για όλους τους αναλύτες. Μεταξύ αυτών, οι

Βενζοφαινόνες (E6300, E4360), που χαρακτηρίζονται ως μέτρια πολικές ενώσεις, παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές ανακτήσεων εν συγκρίσει με τα σαλικυλικά οξέα (EHMS, octylsalicylate) των οποίων η πολικότητα είναι περισσότερο αυξημένη ($\log K_{ow}$, Πίνακας 1.4). Υπολογίστηκαν επίσης τα όρια ανίχνευσης (LOD_s) της προτεινόμενης μεθόδου, τα οποία κυμάνθηκαν από 0.31 έως 2.25 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. Τέλος, θα πρέπει να αναφέρουμε ότι ο αναλύτης E9020, αποκλείστηκε από την όλη πειραματική διαδικασία καθώς ήταν πολύ δύσκολη η ανίχνευση του. Είναι πιθανόν, η ανίχνευση και ταυτοποίηση του να παρεμποδιζόταν από ουσίες που συνεκχύλιζονταν από τα δείγματα εδάφους κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Πίνακας 7.6: Γραμμικότητα, επαναληψιμότητα, αναπαραγωγικότητα, όρια ανίχνευσης (LOD_s) και ανακτήσεις (R%) σε δείγματα εδάφους από την περιοχή της Ηπείρου με τη DLLME μέθοδο.

Αναλύτες	Γραμμικότητα ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	r^2	Επαναλη- ψιμότητα (RSD %)	Αναπαραγω- γικότητα (RSD%)	LOD ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Ανάκτηση (R%) (RSD%)
E6300	2.0-500.0	0.9969	12.0	11.0	0.63	68.0 (7.0)
E4360	1.0-500.0	0.9975	5.2	7.8	0.31	65.1 (4.3)
HMS	7.5-500.0	0.9978	10.4	9.1	2.25	70.9 (11.2)
OD-PABA	4.2-500.0	0.9994	10.9	5.5	1.25	77.9 (8.7)
Octylsalicylate	7.5-500.0	0.9993	6.4	8.9	2.25	71.2 (7.5)

7.1.4.2. Δείγματα Εδάφους

Μετά τα στάδια βελτιστοποίησης και επικύρωσης, η προτεινόμενη μέθοδος εφαρμόστηκε σε δυο διαφορετικούς τύπους εδάφους (Πρέβεζας και Κοζάνης). Τα δείγματα αρχικά ελέγχθησαν για τυχόν υπολείμματα των ουσιών και βρέθηκαν να είναι καθαρά. Για κάθε υπόστρωμα, η ανάλυση έγινε σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων 25, 50 και 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ και η ανάλυση για κάθε δείγμα επαναλήφθηκε από τρεις φορές (Πίνακας 7.7). Από τον Πίνακα 7.7, διαπιστώνεται ότι οι τιμές των ανακτήσεων (R%) για τα δείγματα από την περιοχή της Κοζάνης και της Πρέβεζας είναι υψηλότερες συγκριτικά με αυτές που παρατηρήθηκαν για την περιοχή της Ηπείρου ($R_{\text{Κοζάνη}}\% > R_{\text{Πρέβεζα}}\% > R_{\text{Ηπείρου}}\%$). Αυτό οφείλεται στις σημαντικές διαφορές που παρατηρούνται στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών (Πίνακας 5.2).

Πίνακας 7.7: Προσδιορισμός των φίλτρων UV, ανακτήσεις (R%) και RSD % σε δείγματα εδάφους.

Αναλύτες	Αρχική C ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Πρέβεζα			Κοζάνη		
		Τελική C ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	R%	RSD%	Τελική C ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	R%	RSD%
E6300	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	19.5	78.0	10.1	24.0	96.0	8.8
	50	40.8	81.6	9.3	48.1	92.2	3.9
	100	86.1	86.1	4.5	98.1	98.2	4.0
E4360	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	18.1	72.4	3.3	20.1	80.4	2.5
	50	35.0	70.0	5.2	37.2	74.4	6.6
	100	70.3	70.3	4.1	73.1	73.1	4.9
HMS	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	18.1	72.4	7.8	18.9	75.6	3.3
	50	35.2	70.4	5.6	36.8	73.6	7.8
	100	77.1	77.1	9.1	79.0	79.0	6.1
OD-PABA	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	19.5	78.4	3.9	20.6	82.4	8.1
	50	35.4	70.8	4.6	49.2	98.4	11.2
	100	77.9	77.9	10.1	87.3	87.3	5.7
Octylsalicylate	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	17.5	70.0	8.2	19.0	76.0	13.1
	50	37.9	75.8	7.9	38.9	77.8	10.5
	100	72.3	72.3	2.1	74.5	74.5	8.9

*nd (not detected)= δεν ανιχνεύεται

7.2. Βελτιστοποίηση Της Υγρής Υγρής Μικροεκχύλισης Διασποράς (**DLLME**) Σε Στερεό Υπόστρωμα Για Τις PCMs Και Τους PAEs

7.2.1. Χρωματογραφική Τεχνική

Η χρωματογραφική τεχνική που ακολουθήθηκε σε αυτή την περίπτωση είναι Αέριος Χρωματογράφος συζευγμένος με Φασματογράφο Μάζας (GC-MS). Στο Κεφάλαιο 6, ενότητα 6.2.1 αναφέρεται λεπτομερώς το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε και οι χρόνοι κατακράτησης των ουσιών. Σε αυτή την περίπτωση η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με καμπύλη αναφοράς 6 σημείων, από πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης στον διαλύτη εκχύλισης σε συνάρτηση με τα εμβαδά των κορυφών των αντίστοιχων αναλυτών (οι καμπύλες αναφοράς επαναλαμβάνονταν κάθε μέρα). Η γραμμικότητα των καμπυλών αναφοράς ελέγχθηκε για την περιοχή συγκεντρώσεων από 0.5 έως 10.0 mg L⁻¹. Σε όλες τις περιπτώσεις οι συντελεστές συσχέτισης κυμάνθηκαν πάνω από 0.98.

7.2.2. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς (**DLLME**) Σε Στερεό Υπόστρωμα

Η διαδικασία εμβολιασμού και εκχύλισης των PCMs και των PAEs από δείγματα εδάφους με τη DLLME μέθοδο είχε ως εξής:

Αρχικά κατάλληλη ποσότητα μίγματος προστέθηκε σε 5 mL ακετόνης (τελική συγκέντρωση 25 μg Kg⁻¹) και εμβολιάστηκε σε 1.25 gr δείγματος εδάφους. Τα εμβολιασμένα δείγματα ομογενοποιήθηκαν με ανάδευση και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h μέχρι πλήρους εξάτμισης του διαλύτη. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές διπλές εκπλύσεις των δειγμάτων με 5.52 mL MeOH τοποθετώντας τα σε λουτρό υπερήχων (ισχύς 110W) για 20 min στους 42°C. Οι εκπλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τον διαλύτη διασποράς που έχει ήδη επιλεγεί στο Κεφάλαιο 6, Ενότητα 6.2.3. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φυγόκεντρο στις 5000 rpm για 10 min. Τα υπερκείμενα διαλύματα συνενώθηκαν σε φυγοκεντρικό σωλήνα και συμπυκνώθηκαν στα 0.62 mL MeOH (σύμφωνα με τις

βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν από Κεφάλαιο 6, Ενότητα 6.2.4.3) με τη βοήθεια αέριου αζώτου. Μετά το τέλος της διεργασίας, τα δείγματα MeOH ήταν έτοιμα για την εκχύλιση με τη **DLLME** μέθοδο (Κεφάλαιο 6, Ενότητα 6.2.2).

7.2.3. Πολυπαραγοντική Μέθοδος

Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν για βελτιστοποίηση ήταν η ποσότητα του χρώματος (gr), ο όγκος της MeOH (mL) που χρησιμοποιήθηκε για τις εκπλύσεις των χρωμάτων, ο αριθμός των εκπλύσεων, η θερμοκρασία (°C) και ο χρόνος παραμονής του δείγματος στο λουτρό υπερήχων (min). Για τον υπολογισμό της ανάκτησης χρησιμοποιήθηκε ένας κλασματικός πειραματικός σχεδιασμός δυο σταδίων. Αρχικά εφαρμόστηκε ο σχεδιασμός αξιολόγησης (*Plackett-Burman*), προκειμένου να προσδιοριστούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόκριση και στη συνέχεια ένας σχεδιασμός βελτιστοποίησης (CCD).

7.2.3.1. Σχεδιασμός Αξιολόγησης Plackett-Burman

Ένα 2^{7-4} πειραματικός σχεδιασμός εφαρμόστηκε προκειμένου να προσδιοριστούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Κάθε παράγοντας εξετάσθηκε σε δυο επίπεδα: (-1) το χαμηλότερο και (+1) το υψηλότερο. Συνολικά δεκαέξι πειράματα πραγματοποιήθηκαν, σε τυχαία σειρά, με πέντε πραγματικούς παράγοντες και δυο ψευτομεταβλητές (dummy). Ως μετρήσιμη απόκριση χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή των ανακτήσεων των αναλυτών για κάθε σειρά πειραμάτων (R%). Οι παράγοντες, οι κωδικοποιημένες τιμές και τα επίπεδα τιμών τους παρατίθενται στον Πίνακα 7.8.

Πίνακας 7.8: Οι πειραματικοί παράγοντες, οι κωδικοποιημένες τιμές, τα επίπεδα τιμών τους στον πειραματικό σχεδιασμό Plackett–Burman

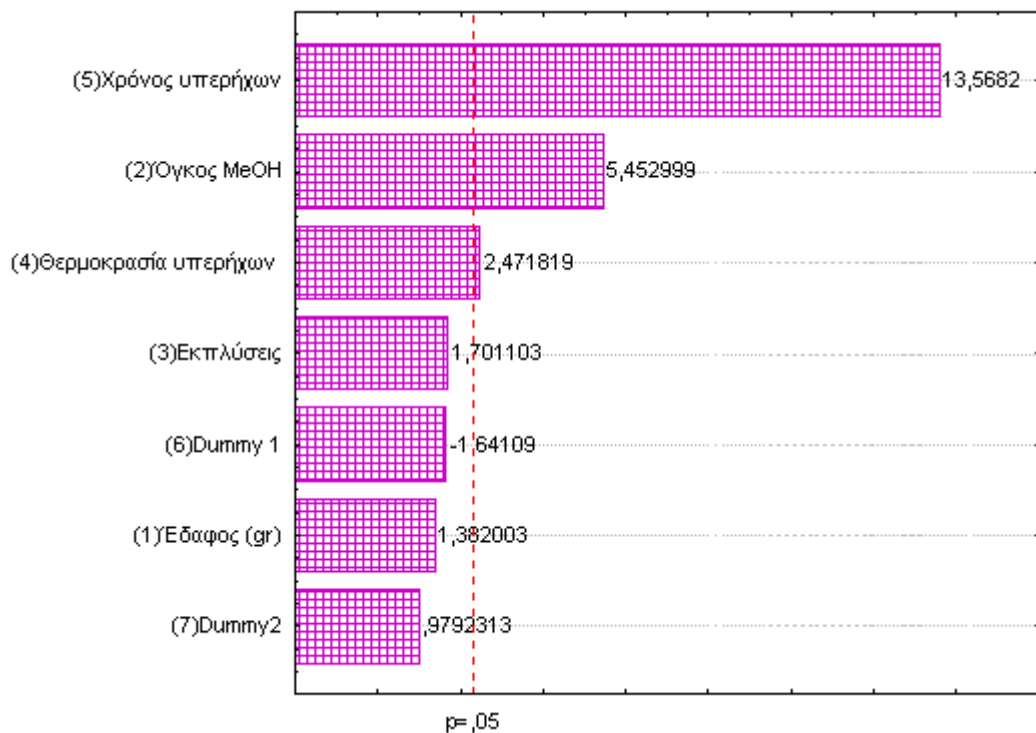
Παράγοντες	Κωδικοποιημένες τιμές	Επίπεδα	
		Χαμηλό (-1)	Υψηλό (+1)
Έδαφος (gr)	S ₁	0.5	2.0
Όγκος MeOH (mL)	S ₂	1	5
Εκπλύσεις	S ₃	1	3
Θερμοκρασία υπερήχων (°C)	S ₄	0	50
Χρόνος υπερήχων (min)	S ₅	10	30
Dummy 1	S ₆	-1	1
Dummy 2	S ₇	-1	1

Σειρά	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	-1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1
10	-1	-1	-1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1
13	-1	-1	1	1	-1	-1	1
14	1	-1	1	-1	1	-1	-1
15	-1	1	1	-1	-1	1	-1
16	1	1	1	1	1	1	1

Στη συνέχεια βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 7.9) και το διάγραμμα Pareto (*Pareto-chart*) (σχήμα 26) για το εκτιμώμενο μοντέλο, προσδιορίσθηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόκριση. Μια πρώτου βαθμού πολυωνυμική εξίσωση (εξίσωση 31) προέκυψε από την ανάλυση των δεδομένων:

$$R\% = 57.42 + 2.52S_1 + 9.95S_2 + 3.10S_3 + 4.51S_4 + 24.75S_5 \quad (31)$$

διαπιστώνοντας ότι οι παράγοντες S_2 (όγκος MeOH), S_4 (Θερμοκρασία υπερήχων) και S_5 (Χρόνος υπερήχων) επιδρούν θετικά στην ανάκτηση της μεθόδου ($p < 0.05$), επιλέγοντας τους για το επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας. Όπως διαπιστώνεται από το διάγραμμα Pareto (σχήμα 26) η επίδραση των παραγόντων S_1 (ποσότητα εδάφους) και S_3 (αριθμός εκπλύσεων) είναι θετική χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική ($p > 0.05$). Γι αυτό το λόγο η χρησιμοποιούμενη ποσότητα εδάφους (S_1) επιλέχθηκε να είναι 1.25 gr και οι εκπλύσεις των δειγμάτων (S_3) να μην ξεπερνούν τις τρεις.



Σχήμα 26: Απεικόνιση του διαγράμματος Pareto για το 2^{7-4} πειραματικό σχεδιασμό Plackett–Burman.

Πίνακας 7.9. Αποτελέσματα δεδομένων για το 2^{7-4} πειραματικό σχεδιασμό Plackett–Burman.

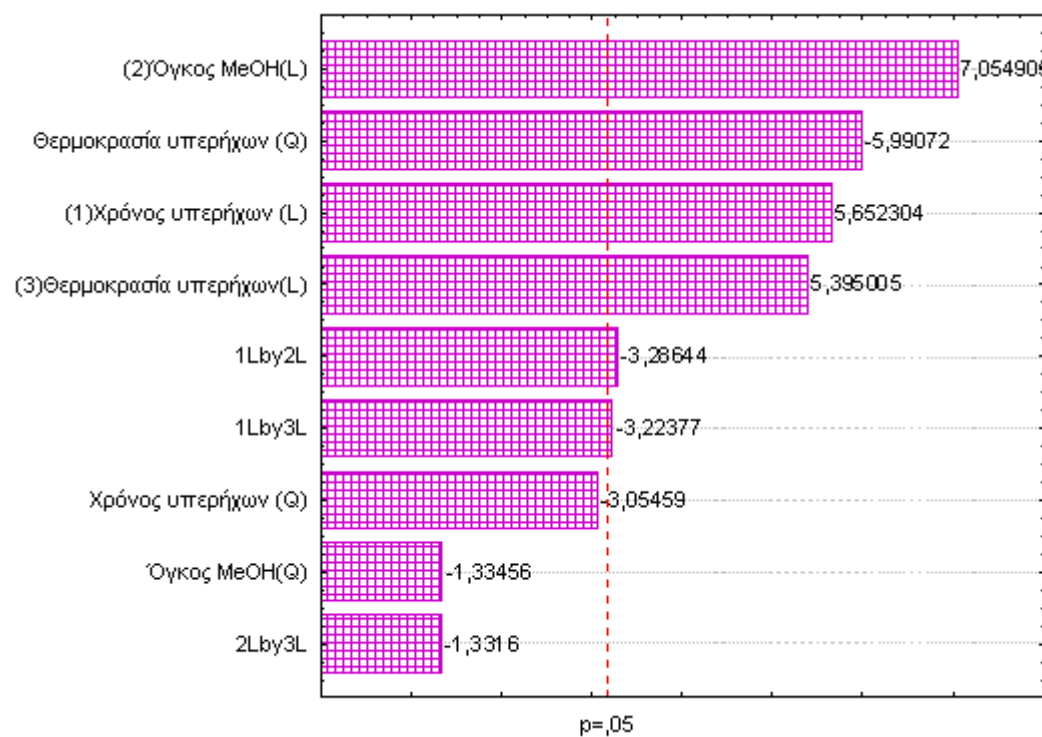
	Επίδραση	Σταθερές	t	p ^a
Αλληλεπίδραση	57.42	57.42	31.48	0.000
S ₁	5.04	2.52	1.38	0.210
S ₂	19.89	9.95	5.45	0.001
S ₃	6.21	3.10	1.70	0.127
S ₄	9.02	4.51	2.47	0.038
S ₅	49.51	24.75	13.57	0.001
S ₆	-5.99	-2.99	-1.64	0.139
S ₇	3.57	1.79	0.97	0.356

7.2.3.2. Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)

Ένας 2^3 κλασματικός πειραματικός σχεδιασμός εφαρμόστηκε με τους προς ανάλυση παράγοντες να είναι: ο όγκος της MeOH (mL) (S_2), η θερμοκρασία των υπερήχων ($^{\circ}\text{C}$) (S_4) και ο χρόνος παραμονής του δείγματος στο λουτρό υπερήχων (min) (S_5). Στον Πίνακα 7.10 παρουσιάζεται αναλυτικά ο πειραματικός σχεδιασμός που εφαρμόστηκε.

Πίνακας 7.10: Σύνολο δεδομένων του Κεντρικού Σύνθετου Σχεδιασμού.

Παράγοντες	Επίπεδα			Κεντρικά σημεία ($\alpha = 1.682$)	
	Χαμηλό (-1)	Κεντρικό (0)	Υψηλό (+1)	- α	+ α
(S ₅) Χρόνος υπερήχων (min)	10.00	20.00	30.00	3.18	36.81
(S ₂) Όγκος MeOH (mL)	1.50	3.00	4.50	0.47	5.52
(S ₄) Θερμοκρασία υπερήχων (°C)	10.00	30.00	45.00	4.77	55.22
Σειρά	S ₅	S ₂	S ₄	R%	
1	-1	-1	-1	20.01	
2	-1	-1	1	55.01	
3	-1	1	-1	70.00	
4	-1	1	1	81.10	
5	1	-1	-1	68.07	
6	1	-1	1	64.52	
7	1	1	-1	79.03	
8	1	1	1	79.11	
9	-1.682	0	0	48.11	
10	+1.682	0	0	77.12	
11	0	-1.682	0	58.14	
12	0	+1.682	0	82.12	
13	0	0	-1.682	30.22	
14	0	0	+1.682	69.49	
15	0	0	0	79.10	
16	0	0	0	82.02	
17	0	0	0	71.11	
18	0	0	0	83.00	



Σχήμα 27: Απεικόνιση του διαγράμματος Pareto για το CCD.

Πίνακας 7.11: Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για τον προτεινόμενο πειραματικό σχεδιασμό.

	SS	df	MS	F-τιμή	ρ-τιμή Πιθανότητα > F	
Μοντέλο	5348.47	9	594.27	20.09	< 0.0001	Σημαντική
S_5	945.14	1	945.14	31.95	0.011	
S_2	1472.41	1	1472.41	49.77	0.006	
S_4	861.06	1	861.06	29.11	0.012	
S_5^2	276.03	1	276.03	9.33	0.056	
S_2^2	52.69	1	52.69	1.78	0.274	
S_4^2	1061.71	1	1061.71	35.89	0.009	
S_5S_2	319.52	1	319.52	10.80	0.046	
S_5S_4	307.45	1	307.45	10.39	0.048	
S_2S_4	52.45	1	52.45	1.77	0.275	
LOF	407.61	5	81.52	2.76	0.221	Ασήμαντη
Σφάλμα	88.75	3	29.58			
Συνολικό SS	5618.06	7				

Από τον Πίνακα 7.11 διαπιστώνεται ότι η τιμή του *LOF* δεν ήταν σημαντική ($p > 0.05$) συγκρινόμενη με το σφάλμα, ενώ η τιμή της σταθεράς προσδιορισμού R^2 (0.91165) ήταν αρκετά ικανοποιητική εκφράζοντας ότι το 91.16 % της διακύμανσης της απόκρισης μπορεί να ερμηνευτεί από το προτεινόμενο μοντέλο. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, παρατηρούνται επιδράσεις πρώτου (S_5 , S_2 , S_4) και δευτέρου (S_4^2) βαθμού καθώς και οι αλληλεπιδράσεις S_5S_2 και S_5S_4 . Η αλληλεπίδραση S_5S_2 είναι ανάμεσα στον χρόνο παραμονής του δείγματος στο λουτρό υπερήχων (S_5) και τον

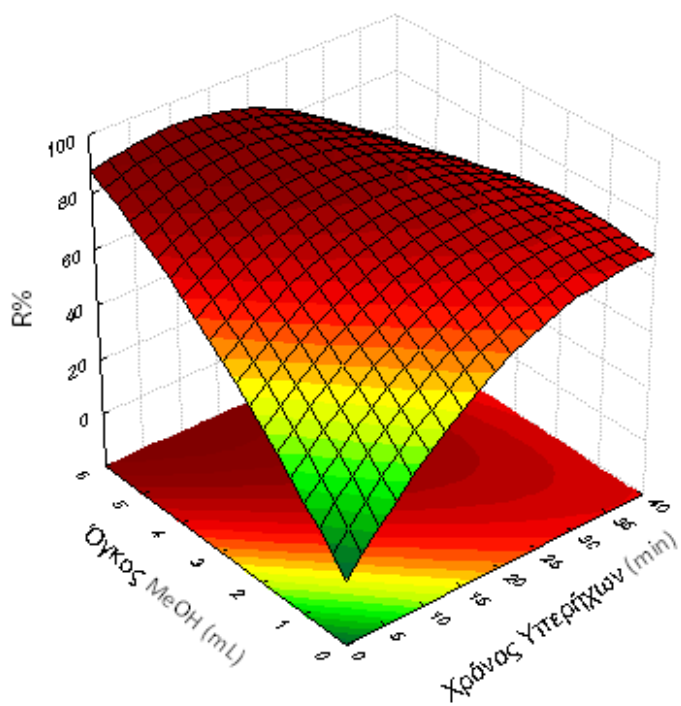
χρησιμοποιούμενο όγκο της MeOH (S_2) ενώ η S_5S_4 ανάμεσα στον χρόνο παραμονής του δείγματος στο λουτρό υπερήχων (S_5) και την θερμοκρασία των υπερήχων (S_4).

Στο τελικό στάδιο του πειραματικού σχεδιασμού, μια δευτέρου βαθμού πολυωνυμική εξίσωση της ανάκτησης (R%) εξήχθη με βάση τα πειραματικά δεδομένα (εξίσωση 32):

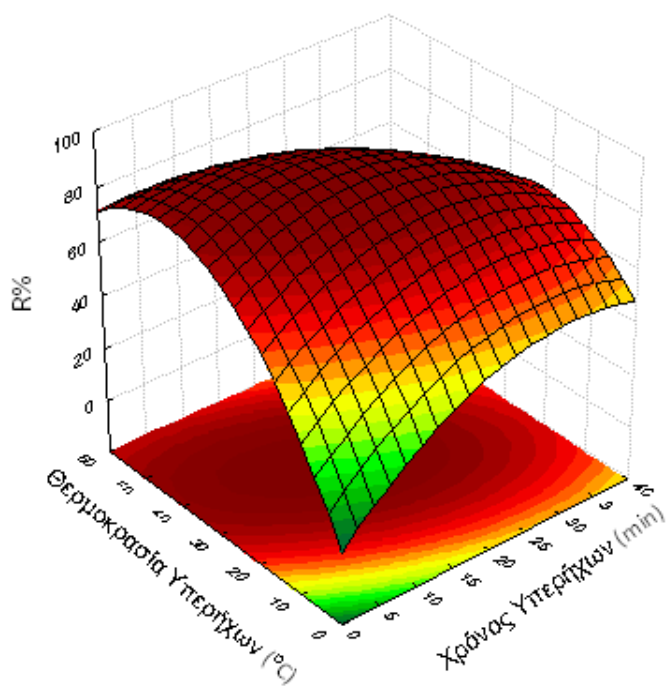
$$R\% = 78.51 + 8.31S_5 + 10.38S_2 + 7.94S_4 - 9.16S_5^2 - 6.31S_5S_2 - 6.19S_5S_4 \quad (32)$$

όπου S_5 είναι ο χρόνος παραμονής του δείγματος στο λουτρό υπερήχων, S_2 ο όγκος της MeOH και S_4 η θερμοκρασία των υπερήχων.

Αναλύοντας την εξίσωση 32 και λαμβάνοντας υπόψη μόνο τις επιδράσεις πρώτου βαθμού, παρατηρείται ότι οι παράγοντες S_5 , S_2 και S_4 επιδρούν θετικά στην ανάκτηση (R%) της μεθόδου. Στα σχήματα 29α και 29β παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις «Όγκος MeOH – Χρόνος υπερήχων» και «Θερμοκρασία υπερήχων – Χρόνος υπερήχων», αντίστοιχα.



(α)



(β)

Σχήμα 28: Τρισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων (α) «Όγκος MeOH – Χρόνος υπερήχων» και (β) «Θερμοκρασία υπερήχων – Χρόνος υπερήχων».

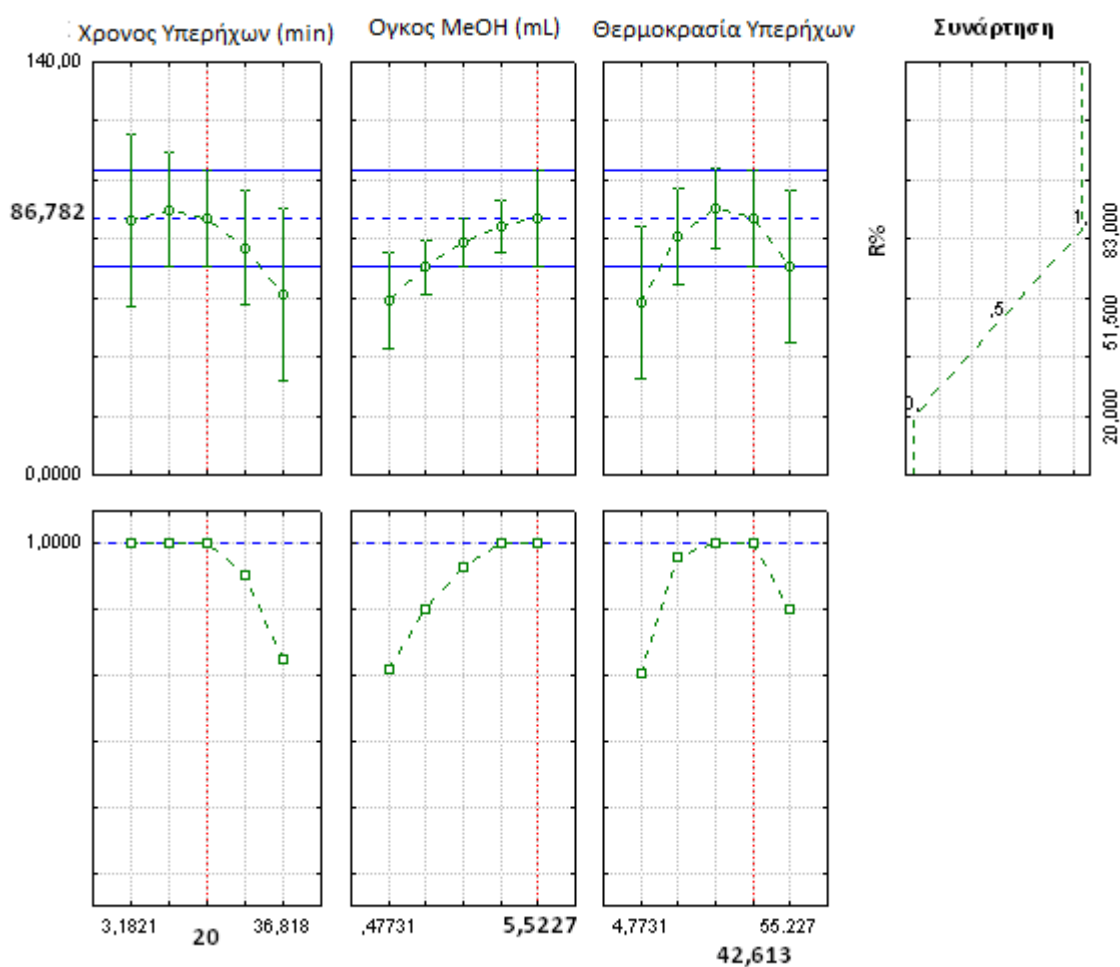
Στο σχήμα 28α, απεικονίζεται η αλληλεπίδραση ανάμεσα στον όγκο της MeOH και τον χρόνο παραμονής του δείγματος στο λουτρό υπερήχων. Από το σχήμα παρατηρούμε ότι, για μικρό όγκο MeOH (0.47 με 1.50 mL) και σύντομο χρόνο ανάδευσης (3 με 10 min) οι αναλύτες δεν εκχυλίζονται ικανοποιητικά, οδηγώντας σε χαμηλές τιμές ανάκτησης ($\approx 15\%$). Περαιτέρω αύξηση του χρόνου (15 έως 30 min), διατηρώντας τον όγκο της MeOH στα ίδια επίπεδα, προκαλούσε μέτρια αύξηση της ανάκτησης ($\approx 65\%$). Επιπλέον άνοδος του χρόνου (> 30 min) δεν επέφερε καμία μεταβολή. Αντίθετα, αυξάνοντας τον όγκο της MeOH (5 με 6 mL), παρατηρήθηκε αύξηση της ανάκτησης φθάνοντας την μέγιστη τιμή της ($\approx 90\%$).

Στο σχήμα 28β, φαίνεται η αλληλεπίδραση ανάμεσα στη θερμοκρασία και τον χρόνο παραμονής του δείγματος στο λουτρό υπερήχων. Από την 3D απεικόνιση παρατηρούμε ότι όταν και οι δυο παράγοντες βρίσκονταν σε χαμηλά επίπεδα τιμών η ανάκτηση κυμαινόταν και αυτή σε χαμηλές τιμές ($\sim 10\%$). Όπως έχουμε προαναφέρει, σε αυτή την περίπτωση, ο χρόνος δεν ήταν επαρκής ώστε να εκχυλιστούν ικανοποιητικά οι αναλύτες. Σταδιακή αύξηση του χρόνου (> 15 min) είχε σαν αποτέλεσμα την άνοδο της τιμής της ανάκτησης έως 45% , διατηρώντας την μετέπειτα σταθερή. Η μέγιστη τιμή της ($\sim 82\%$) επιτεύχθηκε όταν και οι δυο παράγοντες βρέθηκαν να κυμαίνονται σε ενδιάμεσα επίπεδα τιμών. Περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας ($> 50^\circ\text{C}$) είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της ανάκτησης λόγω ημι-πτητικότητας των ουσιών [52].

7.2.3.3. Βελτιστοποίηση Με Τη Μέθοδο Της Επιθυμητής Συνάρτησης (Desirability Function)

Η βελτιστοποίηση των παραγόντων με βάση τη συνάρτηση επιθυμίας επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας τις τιμές της μέγιστης και ελάχιστης ανάκτησης (R%) που παρατηρήθηκαν από το CCD. Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 7.10, η μέγιστη τιμή της ανάκτησης υπολογίστηκε στο 83% και η ελάχιστη στο 20.01% . Στο σχήμα 29 παρατηρούνται οι κωδικοποιημένες τιμές 1, 0.5 και 0.0 που αντιστοιχούν

στη μέγιστη (83.00 %), ενδιάμεση (51.50%) και ελάχιστη (20.00 %) ανάκτηση. Με βάση τους υπολογισμούς που πραγματοποιήθηκαν από το πρόγραμμα, η μέγιστη ανάκτηση υπολογίστηκε στα 86.78% με τις βέλτιστες τιμές για κάθε παράμετρο να είναι 20 min ο χρόνος παραμονής του δείγματος στο λουτρό υπερήχων, 5.52 mL ο όγκος της MeOH και 42.6°C η θερμοκρασία των υπερήχων. Οι παραπάνω τιμές επαληθεύτηκαν πραγματοποιώντας επαναληπτικά πειράματα με τις βέλτιστες συνθήκες.

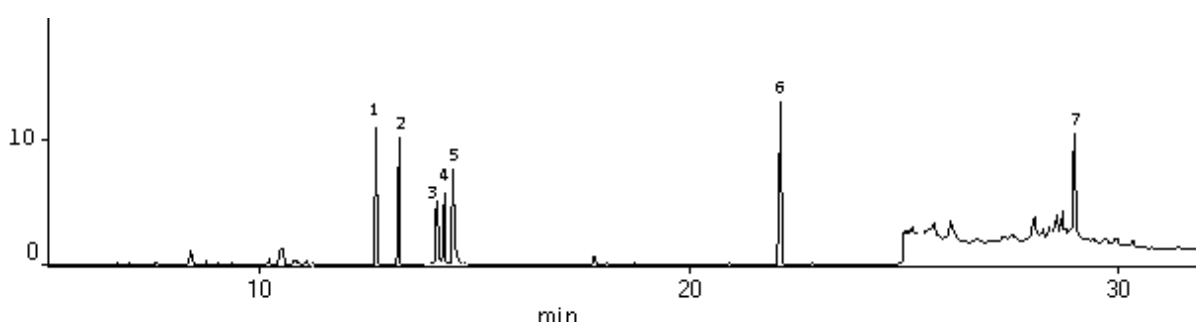


Σχήμα 29: Οι προβλεπόμενες τιμές για τις PCMs και PAEs.

7.2.4. Επικύρωση Της **DLLME** Μεθόδου Σε Στερεό Υπόστρωμα

7.2.4.1. Γραμμικότητα, Πιστότητα Και Ευαισθησία Της Μεθόδου

Η μέθοδος επικυρώθηκε σε δείγματα εδάφους από την περιοχή της Κοζάνης εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν από την ενότητα 7.2.3.1. Στο σχήμα 30 φαίνεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος με το μίγμα των επιλεγμένων αναλυτών σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g Kg}^{-1}$.



Σχήμα 30: Χρωματογράφημα GC-MS ύστερα από εκχύλιση με την μέθοδο **DLLME** των επιλεγμένων PCMs και PAEs σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g Kg}^{-1}$ σε στερεό υπόστρωμα: (1) ADBI, (2) AHMI, (3) ATII, (4) HHCB, (5) AHTN, (6) BBP, (7) DOP.

Η γραμμικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με τον υπολογισμό των σταθερών προσδιορισμού r^2 . Το εύρος γραμμικότητας των αναλυτών κυμάνθηκε μεταξύ του 0.10 έως $10.00 \mu\text{g Kg}^{-1}$, με σταθερές προσδιορισμού μεγαλύτερες ή ίσες με 0.9939 . Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) για την πιστότητα ($n=5 \times 3$ μέρες) και την ημερήσια πιστότητα ($n=15$ δείγματα) της μεθόδου δεν ξεπέρασαν το 12.2% και 7.3% , αντίστοιχα. Τα όρια ανίχνευσης (LOD_s) της μεθόδου κυμάνθηκαν από 25.1 έως 125.0 ng Kg^{-1} για όλους τους αναλύτες, με τις τιμές να είναι αυξημένες συγκριτικά με αυτές που παρατηρήθηκαν για τα δείγματα νερού (Πίνακας 6.15). Οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 85.7 έως 90.9% για τις PCMs και 73.7 με 77.5% για τους PAEs.

Πίνακας 7.12: Γραμμικότητα, επαναληψιμότητα, αναπαραγωγικότητα, όρια ανίχνευσης (LODs) και ανακτήσεις (R%) σε δείγματα εδάφους από την περιοχή της Κοζάνης με τη DLLME μέθοδο.

Αναλύτες	Γραμμικότητα ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	r^2	Επαναληψιμότητα (RSD %)	Αναπαραγωγικότητα (RSD %)	LOD (ng Kg^{-1})	R% (RSD %)
ADBI	0.21-10.00	0.9953	5.5	3.1	64.0	90.9 (8.1)
AHMI	0.21-10.00	0.9939	5.8	1.9	62.5	85.7 (5.5)
ATII	0.41-10.00	0.9994	6.2	12.2	125.0	87.7 (3.2)
HHCB	0.21-10.00	0.9958	4.7	9.3	100.0	89.8 (10.0)
AHTN	0.10-10.00	0.9985	6.1	8.6	80.0	87.9 (4.9)
BBP	0.10-10.00	0.9984	7.3	10.5	25.1	73.7 (1.9)
DOP	0.10-10.00	0.9996	5.1	9.9	55.6	77.5 (8.4)

7.2.4.2. Δείγματα Εδάφους

Μετά τα στάδια βελτιστοποίησης και επικύρωσης, η προτεινόμενη μέθοδος εφαρμόστηκε σε δυο διαφορετικούς τύπους εδάφους (Ηπείρου και Ορεστιάδας). Τα δείγματα αρχικά ελέγχθησαν για τυχόν υπολείμματα των ουσιών και βρέθηκαν να είναι καθαρά. Για κάθε υπόστρωμα, η ανάλυση έγινε σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων 25, 50 και 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ από τρεις φορές (Πίνακας 7.13). Από τον Πίνακα 7.13 διαπιστώνεται ότι οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 60.4 έως 84.1% για το χώμα της Ηπείρου και από 63.6 έως 88% για το χώμα της Ορεστιάδας. Τα αποτελέσματα συγκρινόμενα με αυτά του Πίνακα 7.12 έχουν λογική ($R_{\text{Κοζάνη}}\% > R_{\text{Ορεστιάδας}}\% > R_{\text{Ηπείρου}}\%$) καθώς οι διαφορές που παρατηρούνται οφείλονται στα διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών (Πίνακας 5.2).

Πίνακας 7.13: Ανακτήσεις (R%), RSD % των PCMs και των PAEs σε δείγματα εδάφους.

Αναλύτες	Αρχική C ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Ηπείρου			Ορεσιτιάδα		
		Τελική C	R%	RSD%	Τελική C	R%	RSD%
		($\mu\text{g Kg}^{-1}$)			($\mu\text{g Kg}^{-1}$)		
ADBI	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	21.0	84.1	7.3	21.2	84.9	7.7
	50	37.6	75.2	5.6	40.6	81.2	7.1
	100	69.1	69.1	6.1	71.9	71.9	5.6
AHMI	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	19.1	76.4	6.2	19.5	78.0	3.2
	50	30.6	61.2	4.2	31.8	63.6	4.1
	100	62.5	62.5	5.1	64.8	64.8	3.9
ATII	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	20.4	81.6	5.4	21.1	84.4	8.1
	50	35.2	70.4	5.1	37.5	75.0	7.9
	100	72.5	72.5	4.7	81.5	81.5	7.3
HHCB	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	19.3	77.2	6.1	20.3	81.2	6.1
	50	40.1	80.2	5.8	44.0	88.0	4.3
	100	76.2	76.2	4.4	79.1	79.1	7.1
AHTN	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	19.9	79.6	8.1	21.0	84	6.1
	50	39.5	79.0	6.2	41.2	82.4	10.4
	100	77.9	77.9	6.6	80.2	80.2	7.0
BBP	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	15.1	60.4	3.1	17.7	70.8	11.1
	50	33.5	67.0	3.3	35.1	70.2	9.1
	100	67.9	67.9	6.0	70.1	70.1	9.9
DOP	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	16.9	67.6	9.1	18.1	72.4	3.0
	50	30.5	61.0	9.9	33.2	66.4	8.3
	100	64.2	64.2	8.1	67.9	67.9	8.8

*nd (not detected) = δεν ανιχνεύεται

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ
ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ-ΥΓΡΗΣ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ
ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΤΗΝ ΣΤΕΡΕΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ
ΕΠΙΠΛΕΟΥΣΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ (DLLME-SFO)
ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΥΔΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΦΙΛΤΡΩΝ
UV, PCMs ΚΑΙ ΡΑΕs ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ
ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ.**

8.1. Βελτιστοποίηση της Υγρής Υγρής Μικροεκχύλισης Διασποράς βασιζόμενη στην Στερεοποίηση της Επιπλέουσας Οργανικής Φάσης (**DLLME-SFO**) σε επιφανειακά ύδατα για τα φίλτρα UV

8.1.1. Χρωματογραφική Τεχνική

Για την ταυτοποίηση και τον διαχωρισμό των φίλτρων UV με την **DLLME-SFO** μέθοδο, χρησιμοποιήθηκε Αέριος Χρωματογράφος συζευγμένος με Φασματογράφο Μάζας (GC-MS). Η επιλογή του GC-MS βασίστηκε στον ικανοποιητικό διαχωρισμό μεταξύ της κορυφής του διαλύτη εκχύλισης και των αναλυτών. Το μίγμα αρχικά ελέγχθηκε με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συζευγμένη με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας (HPLC-UV/DAD) αλλά ο διαχωρισμός δεν ήταν ικανοποιητικός και έτσι αποκλείσθηκε.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της στήλης που χρησιμοποιήθηκε ήταν: αρχική θερμοκρασία 50°C για 2 min, άνοδος της θερμοκρασίας στους 190°C με ρυθμό ανόδου 20°C min⁻¹, στη συνέχεια άνοδος της θερμοκρασίας στους 270°C με ρυθμό ανόδου 5°C min⁻¹ και παραμονή στην τελική θερμοκρασία για 5min. Η θερμοκρασία της πηγής των ιόντων ρυθμίστηκε στους 280°C και τα φάσματα ελήφθησαν στα 70eV. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με καμπύλη αναφοράς 6 σημείων, από πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης στον διαλύτη εκχύλισης σε συνάρτηση με τα εμβαδά των κορυφών των αντίστοιχων αναλυτών (οι καμπύλες αναφοράς επαναλαμβάνονταν κάθε μέρα). Η γραμμικότητα των καμπυλών αναφοράς ελέγχθηκε για την περιοχή συγκεντρώσεων από 0.5 έως 10 mg L⁻¹. Σε όλες τις περιπτώσεις οι συντελεστές προσδιορισμού κυμάνθηκαν πάνω από 0.98. Στον Πίνακα 8.1 παρουσιάζονται οι χρόνοι κατακράτησης (t_R) και τα επιλεγμένα ιόντα για κάθε ένα αναλύτη.

Πίνακας 8.1: Χρόνοι κατακράτησης (t_R , min), ιόντα ποσοτικοποίησης και ταυτοποίησης που προσδιορίζονται με τη χρήση GC-MS για τα φίλτρα UV.

Αναλύτες	t_R (min)	Ιόντα ποσοτικοποίησης (m/z)	Ιόντα ταυτοποίησης (m/z)
Octylsalicylate	14.42	120	138, 152, 250
HMS	15.08	120	138, 262
	15.39	195	319
E4360	17.22	227	151, 228
E6300	17.60, 17.70	254	128, 211
OD-PABA	20.88	165	148, 277

8.1.2. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς Βασιζόμενη Στην Στερεοποίηση Της Επιπλέουσας Οργανικής Φάσης (*DLLME-SFO*)

5 mL υδατικού δείγματος τοποθετούνται σε γυάλινο φυγοκεντρικό σωλήνα και προστίθεται το μίγμα των φίλτρων UV σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Στο διάλυμα προστίθενται το NaCl (0.125 gr) και εμβολιάζεται το μίγμα των διαλυτών διασποράς και εκχύλισης (1.67 mL ακετόνης και 251 μL 1-DD-OH). Το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς, σχηματίζοντας πολλές μικρές σταγόνες (παρατηρείται ο σχηματισμός θολώματος), οι οποίες διασπείρονται σε όλη την επιφάνεια του διαλύματος, με τους αναλύτες να εκχυλίζονται εντός αυτών. Στην συνέχεια το διάλυμα τοποθετείται στην φυγόκεντρο για 5 min στις 4000 στροφές (rpm). Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, στην επιφάνεια του υδατικού διαλύματος παρατηρείται να "επιπλέει" ο διαλύτης εκχύλισης (1-DD-OH), λόγω μικρότερης πυκνότητας από αυτής του νερού (Πίνακας 2.7). Η απομάκρυνση του από το υδατικό διάλυμα πραγματοποιείται με την στερεοποίηση του, φαινόμενο το οποίο οφείλεται στο χαμηλό σημείο τήξεως του (Πίνακας 2.7). Για να επιτευχθεί η ταχεία στερεοποίηση του, το διάλυμα

τοποθετείται σε παγόλουτρο για 5 min και στη συνέχεια με τη βοήθεια μιας λαβίδας απομακρύνεται. Τέλος, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για λίγα λεπτά ώστε να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση και 2μL εγχέονται εντός του GC-MS.

8.1.3. Προκαταρκτικά Πειράματα

Τα προκαταρκτικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν με στόχο τον προσδιορισμό του κατάλληλου συνδυασμού διαλυτών εκχύλισης και διασποράς. Η επιλογή αυτών έγινε με γνώμονα τα κριτήρια που έχουμε ήδη αναφέρει στο Κεφάλαιο 2, Ενότητα 2.5.2.1. Οι διαλύτες εκχύλισης και διασποράς που επιλέχθηκαν είναι: 1-ενδεκανόλη (1-UD-OH), 1-δωδεκανόλη (1-DD-OH), 2-δωδεκανόλη (2-DD-OH), *n*-εξαδεκάνιο (*n*-HD) και μεθανόλη, ακετόνη, αντίστοιχα.

Επιλογή διαλύτη εκχύλισης

Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν διαπιστώθηκε ότι ο διαλύτης που παρουσίαζε την καλύτερη χρωματογραφική συμπεριφορά αλλά και τις υψηλότερες τιμές ανακτήσεων ήταν η 1-DD-OH. Οι υπόλοιποι διαλύτες (1-UD-OH, 2-DD-OH) απορρίφθηκαν καθώς οι ανακτήσεις που παρατηρήθηκαν ήταν αρκετά χαμηλές ενώ ο υδρόφοβος χαρακτήρας του *n*-HD δεν άφηνε περιθώρια ανάμιξης του με τους επιλεγμένους διαλύτες διασποράς.

Επιλογή διαλύτη διασποράς

Αφού επιλέχθηκε ο διαλύτης εκχύλισης, επόμενο βήμα ήταν η επιλογή του διαλύτη διασποράς. Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν διαπιστώθηκαν υψηλές τιμές ανακτήσεων όταν η 1-DD-OH συνδυαζόταν με την ακετόνη ενώ χαμηλές όταν χρησιμοποιούνταν μεθανόλη. Κρίνοντας από τα αποτελέσματα των πειραμάτων, η ακετόνη επιλέχθηκε ως ο καταλληλότερος διαλύτης διασποράς.

8.1.4. Πολυπαραγοντική Μέθοδος

Όπως στην περίπτωση της **DLLME** μεθόδου έτσι και για την **DLLME-SFO**, κρίνεται απαραίτητη η μελέτη και η βελτιστοποίηση των παραμέτρων που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης (εκφραζόμενη ως ανάκτηση, R%). Γι αυτό το λόγο, εφαρμόστηκε αρχικά ο σχεδιασμός αξιολόγησης (Plackett-Burman), ώστε να προσδιοριστούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόκριση και στη συνέχεια ένας σχεδιασμός βελτιστοποίησης (CCD). Οι πειραματικοί σχεδιασμοί και η εξαγωγή των αποτελεσμάτων έγιναν με τη χρήση του προγράμματος STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

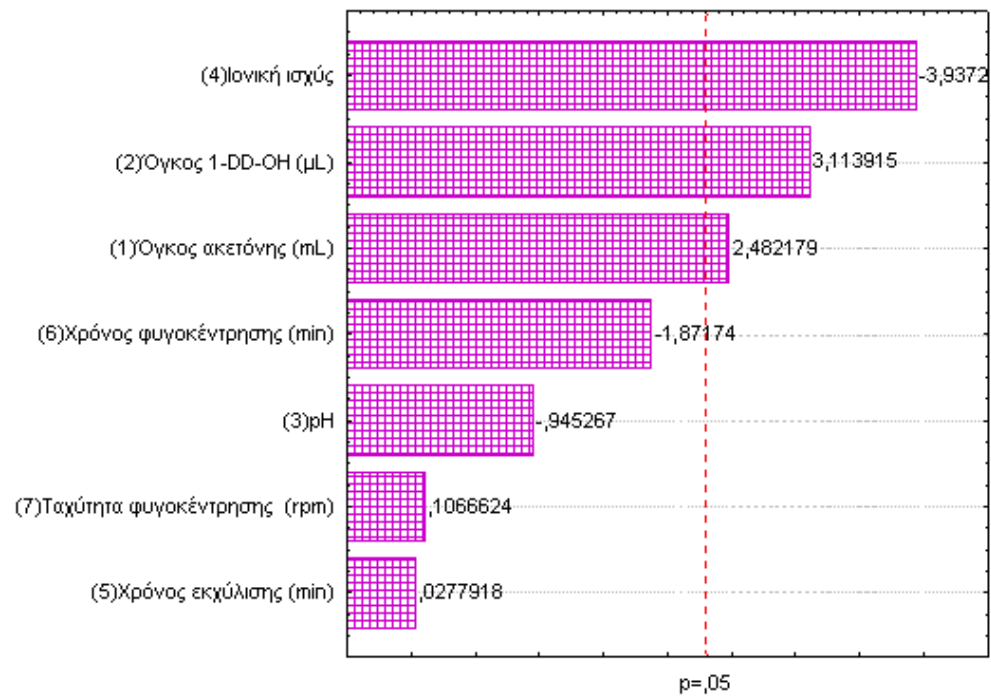
8.1.4.1. Σχεδιασμός Αξιολόγησης Plackett-Burman

Πολλοί είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόκριση της **DLLME-SFO** μεθόδου, είτε θετικά είτε αρνητικά. Στην παρούσα διατριβή επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί ο 2^{7-4} πειραματικός σχεδιασμός, με τον κάθε παράγοντα να εξετάζεται σε δυο επίπεδα: (-1) το χαμηλότερο και (+1) το υψηλότερο. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν δεκαέξι πειράματα με τους προς ανάλυση παράγοντες να είναι: ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης (μL), ο όγκος του διαλύτη διασποράς (mL), pH, ιοντική ισχύς (NaCl, w/v %), ο χρόνος εκχύλισης (min), ο χρόνος φυγοκέντρωσης (min) και η ταχύτητα φυγοκέντρωσης (rpm). Ως μετρήσιμη απόκριση χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή των ανακτήσεων των αναλυτών για κάθε σειρά πειραμάτων (R%). Οι παράγοντες, οι κωδικοποιημένες τιμές και τα επίπεδα τιμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.2.

Πίνακας 8.2: Οι πειραματικοί παράγοντες, οι κωδικοποιημένες τιμές, τα επίπεδα τιμών τους για τον πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman.

Παράγοντες	Κωδικοποιημένες τιμές	Επίπεδα	
		Χαμηλό (-1)	Υψηλό(+1)
Όγκος ακετόνης (mL)	T ₁	0.5	2.0
Όγκος 1-DD-OH (μL)	T ₂	50	200
pH	T ₃	3	11
Ιοντική ισχύς (NaCl, w/v %)	T ₄	0	5
Χρόνος εκχύλισης (min)	T ₅	1	3
Χρόνος φυγοκέντρησης (min)	T ₆	2	10
Ταχύτητα φυγοκέντρησης (rpm)	T ₇	1000	4000

Σειρά	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1
4	-1	1	1	-1	-1	1	-1
5	1	-1	-1	-1	-1	1	1
6	-1	1	-1	-1	1	1	1
7	-1	-1	1	1	-1	-1	1
8	-1	-1	1	1	-1	-1	1
9	-1	-1	-1	1	1	-1	-1
10	1	1	-1	1	-1	-1	-1
11	-1	1	-1	-1	1	-1	1
12	1	-1	-1	-1	-1	1	1
13	-1	1	1	-1	-1	1	-1
14	1	-1	1	-1	1	-1	-1
15	1	-1	1	-1	1	-1	-1
16	1	1	-1	1	-1	-1	-1



Σχήμα 31: Απεικόνιση του διαγράμματος Pareto για τον 2^{7-4} πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman.

Πίνακας 8.3. Αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για τον 2^{7-4} πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman.

	Επίδραση	Σταθερές	t	p
Αλληλεπίδραση	67.90	67.90	25.60	0.000
T ₁	13.18	6.59	2.48	0.038
T ₂	16.53	8.27	3.11	0.014
T ₃	-5.01	-2.51	-0.95	0.372
T ₄	-20.90	-10.45	-3.94	0.004
T ₅	0.15	0.07	0.03	0.978
T ₆	-9.94	-4.96	-1.87	0.098
T ₇	0.57	0.28	0.11	0.917

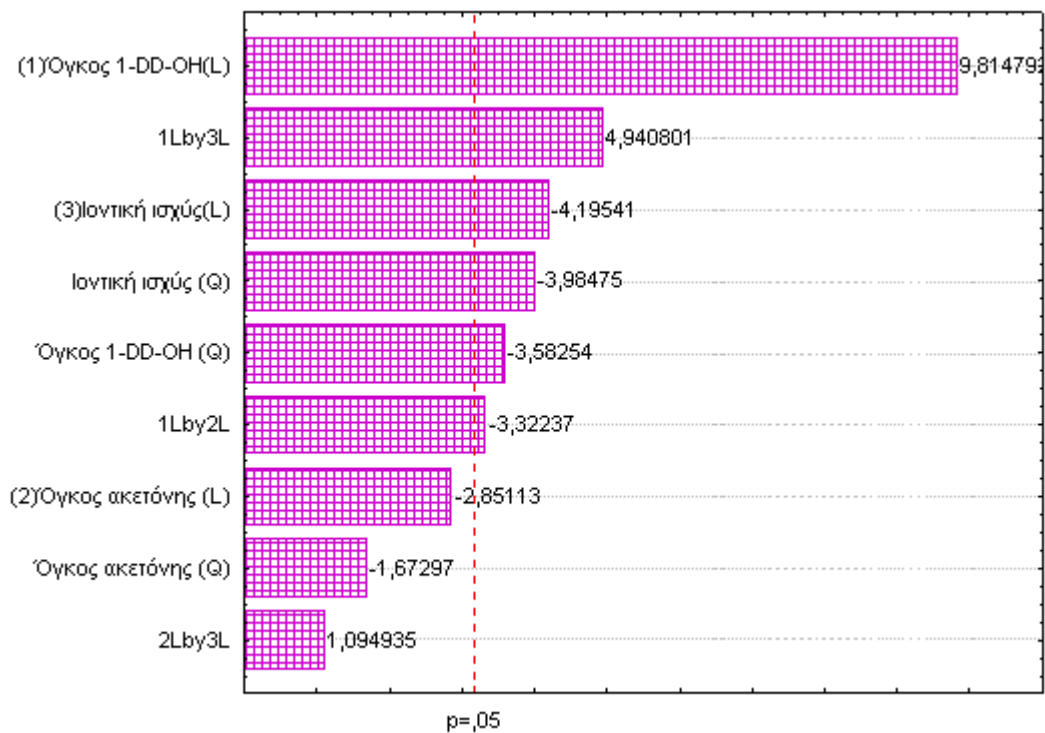
Στη συνέχεια βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 8.3) και το διάγραμμα Pareto (*Pareto-chart*) (σχήμα 31) για το εκτιμώμενο μοντέλο, προσδιορίσθηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόκριση της μεθόδου. Οι T_1 , T_2 και T_4 ($p < 0.05$) βρέθηκαν να επιδρούν στην ανάκτηση της μεθόδου, με τους όγκους της ακετόνης (T_1) και της 1-DD-OH (T_2) να παρουσιάζουν θετική επίδραση ενώ η ιοντική ισχύς (T_4) αρνητική. Εν κατακλείδι, στο επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας επιλέχθηκαν για βελτιστοποίηση ο όγκος της ακετόνης (T_1), ο όγκος της 1-DD-OH (T_2) και η ιοντική ισχύς (T_4). Ο χρόνος φυγοκέντρησης διατηρήθηκε στα 5 min, καθώς παρατηρήθηκε αρνητική επίδραση από το χαμηλό στο υψηλό επίπεδο τιμών, το pH = 7 και η ταχύτητα φυγοκέντρησης στις μέγιστες στροφές (4000 rpm).

8.1.4.2. Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)

Αφού επιλέχθηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν, στατιστικά σημαντικά την απόκριση της μεθόδου, επόμενο βήμα είναι η βελτιστοποίηση αυτών ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή ανάκτηση (R%). Ένας 2^3 κλασματικός πειραματικός σχεδιασμός εφαρμόστηκε, ο οποίος παρουσιάζεται αναλυτικά στον Πίνακα 8.4.

Πίνακας 8.4: Σύνολο δεδομένων του Κεντρικού Σύνθετου Σχεδιασμού

Παράγοντες	Επίπεδα			Κεντρικά σημεία	
				($\alpha = 1.682$)	
	Χαμηλό (-1)	Κεντρικό (0)	Υψηλό (+1)	- α	+ α
(T ₁) Όγκος 1-DD-OH (μL)	90	150	210	49	251
(T ₂) Όγκος ακετόνης (mL)	0.60	1.00	1.40	0.33	1.67
(T ₄) Ιοντική ισχύς (NaCl, w/v %)	1.50	2.00	2.50	1.16	2.84
Σειρά	T ₁	T ₂	T ₄	R%	
1	-1	-1	-1	68.0	
2	-1	-1	1	40.1	
3	-1	1	-1	56.2	
4	-1	1	1	41.6	
5	1	-1	-1	80.7	
6	1	-1	1	86.3	
7	1	1	-1	59.0	
8	1	1	1	62.8	
9	-1.682	0	0	48.0	
10	+1.682	0	0	79.1	
11	0	-1.682	0	64.4	
12	0	+1.682	0	73.9	
13	0	0	-1.682	69.6	
14	0	0	+1.682	55.0	
15	0	0	0	70.1	
16	0	0	0	77.1	
17	0	0	0	73.9	
18	0	0	0	68.9	



Σχήμα 32: Απεικόνιση του διαγράμματος Pareto για το CCD.

Πίνακας 8.5: Αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για τον προτεινόμενο πειραματικό σχεδιασμό.

	SS	df	MS	F-τιμή	ρ-τιμή Πιθανότητα > F	Παρατηρήσεις
Μοντέλο	2645.90	9	294.00	21.10	< 0.0001	Σημαντική
T ₁	1339.91	1	1339.91	96.33	0.002	
T ₂	113.07	1	113.07	8.13	0.065	
T ₄	244.83	1	244.83	17.60	0.025	
T ₁ ²	178.52	1	178.52	12.83	0.037	
T ₂ ²	38.93	1	38.93	2.80	0.192	
T ₄ ²	220.86	1	220.86	15.88	0.028	
T ₁ T ₂	153.54	1	153.54	11.04	0.045	
T ₁ T ₄	339.55	1	339.55	24.41	0.015	
T ₂ T ₄	16.68	1	16.68	1.19	0.353	
LOF	374.11	5	74.82	5.38	0.098	Ασήμαντη
Σφάλμα	41.73	3	13.91			
Συνολικό SS	2956.01	17				

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 8.5) και το διάγραμμα Pareto (σχήμα 32) χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία και ερμηνεία των δεδομένων. Η τιμή του LOF δεν ήταν σημαντική με $p > 0.05$, ενώ αρκετά ικανοποιητική βρέθηκε να είναι η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 (0.860) εκφράζοντας ότι το 86 % της διακύμανσης της απόκρισης μπορεί να ερμηνευτεί από το προτεινόμενο μοντέλο. Σε αυτή την περίπτωση, έξι επιδράσεις βρέθηκαν να είναι στατιστικά σημαντικές: T₁, T₄, T₁², T₄², T₁T₂, T₁T₄. Η αλληλεπίδραση

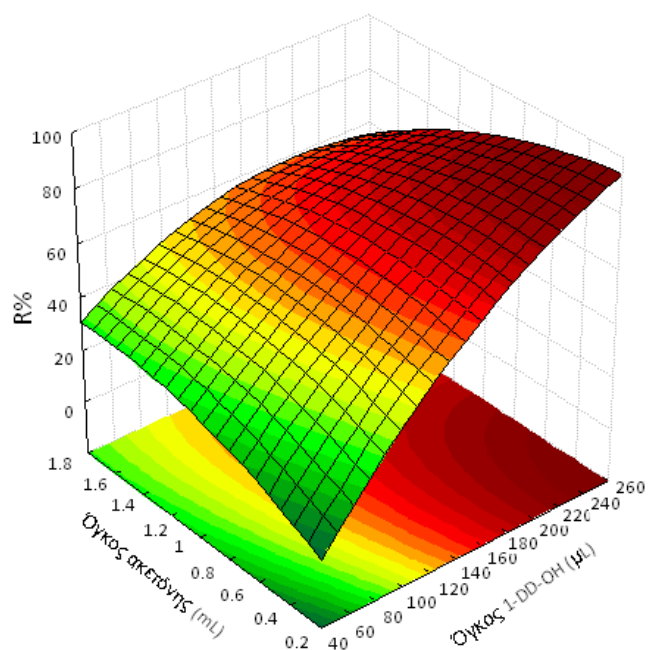
T_1T_2 είναι ανάμεσα στον όγκο της 1-DD-OH και της ιοντικής ισχύος ενώ η T_1T_4 ανάμεσα στο όγκο της 1-DD-OH και της ακετόνης.

Στο τελικό στάδιο του σχεδίου, μια δευτέρου βαθμού πολυωνυμική εξίσωση της ανάκτησης (R%) αναπτύχθηκε για να εκφράσει το προτεινόμενο μοντέλο (εξίσωση 33):

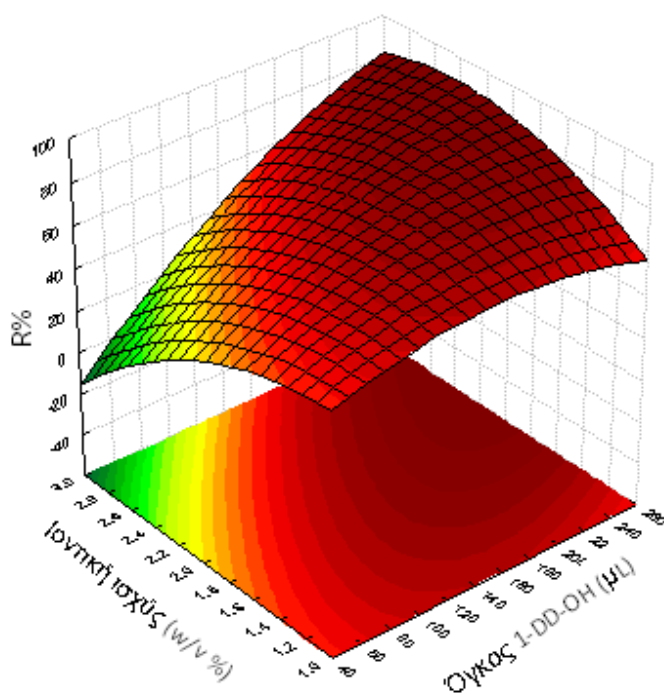
$$R\% = 72.6 + 9.90T_1 - 4.23T_4 - 3.76T_1^2 - 4.18T_4^2 - 4.38T_1T_2 + 6.51T_1T_4 \quad (33)$$

όπου T_1 , T_2 και T_4 είναι οι κωδικοποιημένες τιμές των παραγόντων.

Οι σταθερές της εξίσωσης 33 σε συνδυασμό με το διάγραμμα Pareto (σχήμα 32) φανερώνουν τις θετικές και αρνητικές επιδράσεις που παρουσιάζουν οι παράγοντες. Διαπιστώνεται ότι ο όγκος της 1-DD-OH (T_1) έχει την μεγαλύτερη θετική επίδραση (+9.90) στην απόκριση της μεθόδου, με την αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων «όγκος 1-DD-OH - όγκος ακετόνης-» (T_1T_4) να ακολουθεί. Οι υπόλοιποι (T_4 , T_1^2 , T_4^2 , T_1T_2) παρουσιάζουν αρνητική επίδραση. Στο σχήμα 33 απεικονίζονται σε τρισδιάστατη μορφή (3D) οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους παράγοντες «όγκος 1-DD-OH - όγκος ακετόνης» (T_1T_4) (σχήμα 33α) και «ιοντική ισχύς-όγκος 1DD-OH» (σχήμα 33β).



(α)



(β)

Σχήμα 33: Τρισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που επηρεάζουν την απόκριση της μεθόδου (α) «όγκος 1-DD-OH - όγκος ακετόνης» και (β) «όγκος 1-DD-OH- Ιοντική ισχύς».

Παρατηρώντας το σχήμα 33α, διαπιστώνουμε ότι όταν χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα μικροί όγκοι από τους διαλύτες διασποράς (ακετόνη) και εκχύλισης (1-DD-OH) η απόδοση της εκχύλισης, εκφραζόμενη ως ανάκτηση (R%), είναι χαμηλή (~15%). Η συμπεριφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στο ότι ο μικρός όγκος του διαλύτη διασποράς δεν επαρκεί ώστε να διασπείρει κατάλληλα τον διαλύτη εκχύλισης εντός του υδατικού διαλύματος (σχηματισμός θολώματος) [278]. Στη συνέχεια, αυξάνοντας σταδιακά τον όγκο της ακετόνης από 0.4 έως 1.8 mL διατηρώντας παράλληλα σταθερό τον όγκο της 1-DD-OH (40 μ L) παρατηρείται μια μικρή αύξηση της ανάκτησης (~35%). Στην αντίθετη περίπτωση, διατηρώντας σταθερό τον όγκο της ακετόνης (0.4-0.6 mL) και αυξάνοντας σταδιακά τον όγκο της 1-DD-OH παρατηρείται αύξηση της ανάκτησης φθάνοντας τη μέγιστη τιμή (~90%). Η συμπεριφορά αυτή του συστήματος οφείλεται στην αύξηση του όγκου της επιπλέουσας φάσης (V_{floated}) οδηγώντας σε αύξηση της ανάκτησης. Καταλήγοντας, η μέγιστη ανάκτηση (~90%). παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε μικρός όγκος ακετόνη (0.4-0.6 mL) και μεγάλος όγκος 1-DD-OH (240-260 μ L).

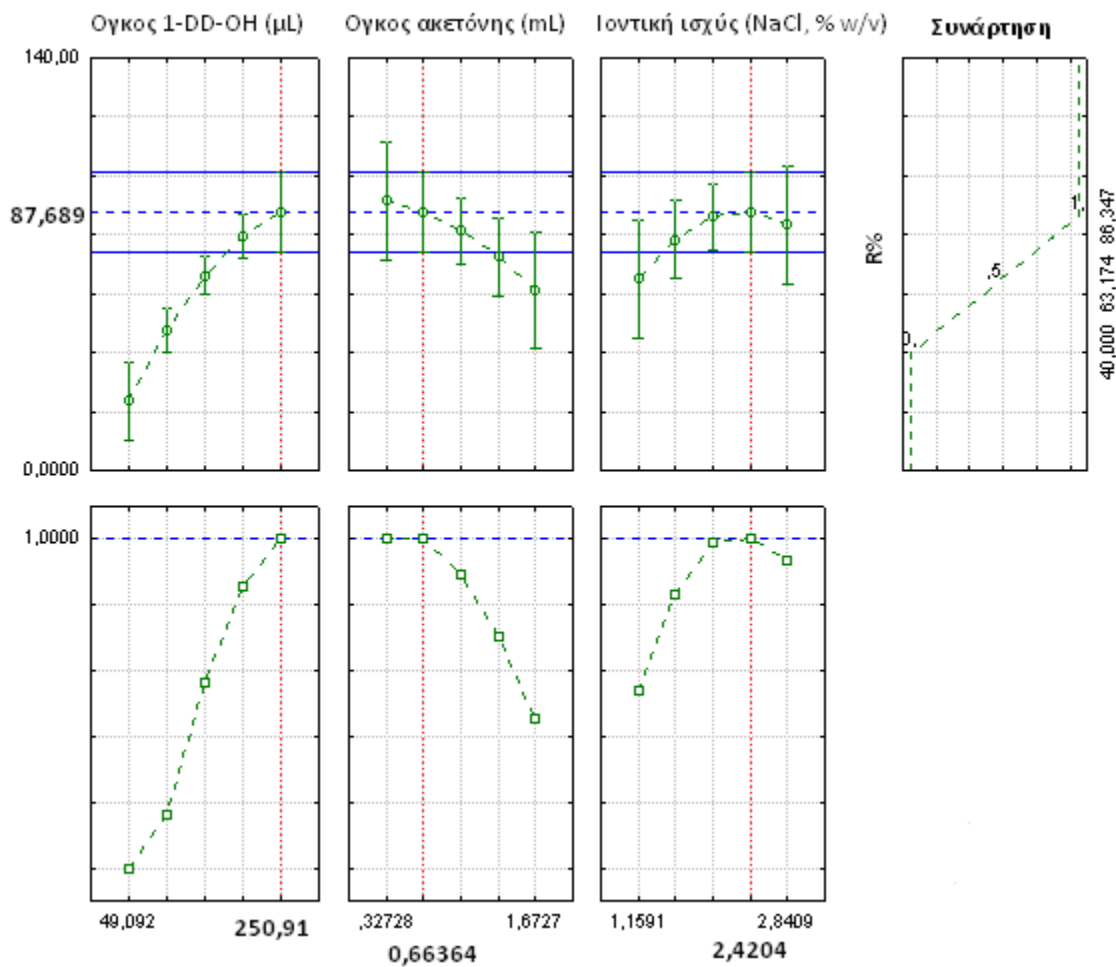
Εν συνεχεία, στο σχήμα 33β απεικονίζεται η αλληλεπίδραση ανάμεσα στον όγκο του διαλύτη εκχύλισης (1-DD-OH) και την ιοντική ισχύ (NaCl, w/v %). Σύμφωνα με το σχήμα, παρατηρούμε ότι η προοδευτική αύξηση του όγκου του διαλύτη εκχύλισης (1-DD-OH) (από 40 έως 250 μ L) διατηρώντας παράλληλα σταθερή την ποσότητα του NaCl (1.0-1.2% w/v) είχε σαν αποτέλεσμα την σταθερή τιμή της ανάκτησης (~60%). Σταδιακή αύξηση της ποσότητας του αλάτος (2.0 έως 2.4 % w/v) με την διατήρηση του όγκου της 1-DD-OH σε μεγάλες τιμές (220-250 μ L) είχε ως επακόλουθο την αύξηση της ανάκτησης (~80%). Η αύξηση της ποσότητας του αλάτος οδηγεί σε αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος προκαλώντας μείωση της διαλυτότητας των αναλυτών και του διαλύτη εκχύλισης εντός του υδατικού διαλύματος. Αυτό οδηγεί σε αύξηση του όγκου της επιπλέουσας φάσης με επακόλουθη αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης (R%) [270, 275]. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του NaCl (2.4 έως 3.0 % w/v) διατηρώντας σταθερό τον

όγκο της 1-DD-OH (220-250 μL) δεν οδήγησε σε αύξηση της ανάκτησης (R%) καθώς επήλθε ο κορεσμός. Επιπλέον, η υψηλή συγκέντρωση του NaCl εντός του υδατικού διαλύματος προκαλεί αύξηση του ιζήδους, περιορίζοντας την δυνατότητα εκχύλισης των ουσιών [271]. Εν αντιθέσει, όταν ο όγκος της 1-DD-OH ήταν μικρός (40-60 μL) η ανάκτηση της μεθόδου ήταν πολύ χαμηλή. Εν κατακλείδι, η μέγιστη τιμή της ανάκτησης (~80%) βρέθηκε όταν η συγκέντρωση του NaCl ήταν σε ενδιάμεσες τιμές (2.0 έως 2.4 % w/v) και ο όγκος της 1-DD-OH σε μέγιστες τιμές (~250 μL).

8.1.4.3. Βελτιστοποίηση Με Τη Μέθοδο Της Επιθυμητής Συνάρτησης (Desirability Function)

Επόμενο βήμα της πειραματικής διαδικασίας είναι η βελτιστοποίηση των παραγόντων που επηρεάζουν την απόκριση, με τη μέθοδο της επιθυμητής συνάρτησης. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα από το CCD σχεδιασμό (Πίνακας 8.4), η μέγιστη και ελάχιστη ανάκτηση (R%) που παρατηρήθηκε ήταν 86.3 και 40.1 %, αντίστοιχα. Στα δεξιά του σχήματος 34 απεικονίζονται τα δεδομένα της επιθυμητής συνάρτησης για κάθε παράγοντα: η κωδικοποιημένη τιμή 1.0 εκφράζει τη μέγιστη ανάκτηση ($R=86.3\%$), η 0.0 την ελάχιστη (40.1%) και 0.5 την ενδιάμεση (63.2%). Στο αριστερό κάτω τμήμα του σχήματος βρίσκονται οι βέλτιστες τιμές για κάθε μια παράμετρο ξεχωριστά σύμφωνα με τον μέσο όρο της ανάκτησης (R%).

Με βάση τους υπολογισμούς που πραγματοποιήθηκαν από το πρόγραμμα, η μέγιστη ανάκτηση (R%) της μεθόδου υπολογίστηκε στα 87.7%, με τις βέλτιστες τιμές για κάθε παράμετρο να είναι 251 μL 1-DD-OH, 0.664 mL ακετόνης και 2.42 % w/v NaCl. Για να επαληθευτούν οι παραπάνω τιμές πραγματοποιήθηκαν επαναληπτικά πειράματα με τις βέλτιστες συνθήκες.

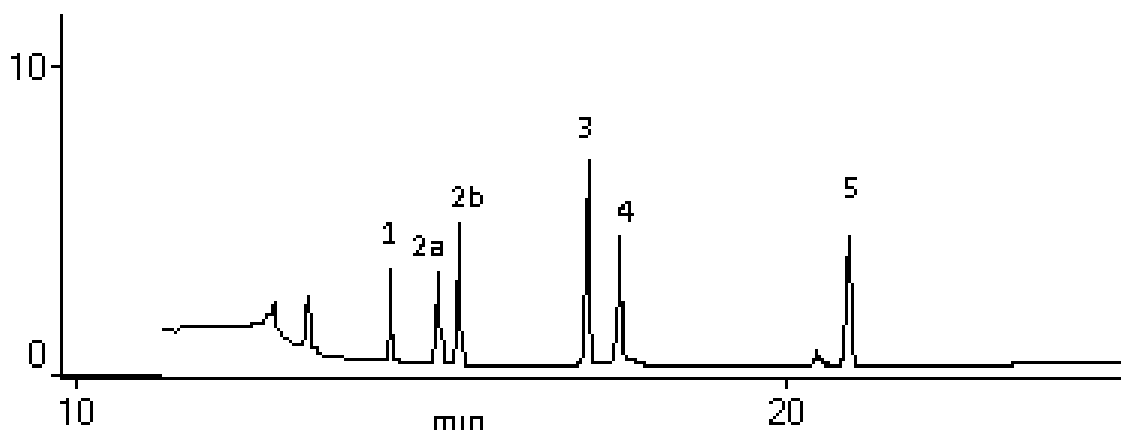


Σχήμα 34: Οι προβλεπόμενες τιμές για τα φίλτρα UV.

8.1.5. Επικύρωση Της **DLLME-SFO** Μεθόδου

8.1.5.1. Γραμμικότητα, Πιστότητα Και Ευαισθησία Της Μεθόδου

Η επικύρωση της **DLLME-SFO** μεθόδου ελέγχθηκε σε νερό πηγής εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν από την Ενότητα 8.1.4.3, σε συγκέντρωση 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ μίγματος φίλτρων UV. Στο σχήμα 35 φαίνεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος με το μίγμα των επιλεγμένων αναλυτών σε συγκέντρωση 25 $\mu\text{g L}^{-1}$.



Σχήμα 35: Χρωματογράφημα GC-MS ύστερα από εκχύλιση με την μέθοδο **DLLME-SFO** των επιλεγμένων φίλτρων UV σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g L}^{-1}$: (1) octylsalicylate, (2 a, 2b) HMS, (3) E4360, (4) E6300, (5) OD-PABA.

Η γραμμικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με τον υπολογισμό των σταθερών προσδιορισμού r^2 . Το εύρος γραμμικότητας των αναλυτών κυμάνθηκε μεταξύ του 0.21 έως $500.00 \mu\text{g L}^{-1}$ για όλους του αναλύτες, με σταθερές προσδιορισμού μεγαλύτερες ή ίσες με 0.9955 . Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) για την πιστότητα ($n=5 \times 3$ μέρες) και την ημερήσια πιστότητα ($n=15$ δείγματα) της μεθόδου δεν ξεπέρασαν το 10.6 και 12.0 %, αντίστοιχα. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου κυμάνθηκαν από 62.5 έως 260.0 ng L^{-1} για όλους τους αναλύτες που αναλύθηκαν. Οι τιμές των ανακτήσεων κυμάνθηκαν από 77.1 έως 101.7 %, με το E4360 να παρουσιάζει την μικρότερη ανάκτηση λόγω ενδιάμεσης πολικότητας ($\log K_{ow} = 3.52$) συγκρινόμενο με τα υπόλοιπα φίλτρα UV. Όλα τα παραπάνω παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.6.

Πίνακας 8.6: Γραμμικότητα, επαναληψιμότητα, αναπαραγωγικότητα, όρια ανίχνευσης (LOD_s) και ανακτήσεις (R%) σε νερό πηγής με τη μέθοδο *DLLME-SFO*.

Αναλύτες	Γραμμικότητα ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Επαναλη- ψιμότητα (RSD %)	Αναπαραγω- γικότητα (RSD%)	LOD (ng L^{-1})	Ανάκτηση (R%)
E6300	0.45 – 500.00	0.9999	6.0	10.5	125.0	88.0
E4360	0.21 – 500.00	0.9975	12.0	10.6	62.5	77.1
HMS	0.40 – 500.00	0.9955	4.8	2.5	112.0	101.7
OD-PABA	0.45 – 500.00	0.9998	11.4	2.5	125.0	79.1
Octylsalicylate	0.90 – 500.00	0.9977	6.8	1.9	260.0	99.3

8.1.5.2. Δείγματα Νερού

Μετά τα στάδια βελτιστοποίησης και επικύρωσης, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε τρεις διαφορετικούς τύπους υδάτων (θαλασσίο, λιμναίο και ποτάμιο). Τα δείγματα αρχικά ελέγχθησαν για τυχόν υπολείμματα των ουσιών και βρέθηκαν να είναι καθαρά. Για κάθε υπόστρωμα, η ανάλυση έγινε σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων 25, 50 και 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ και η ανάλυση για κάθε δείγμα επαναλήφθηκε από τρεις φορές. Συγκρίνοντας τις ανακτήσεις που προέκυψαν για τους τρεις τύπους νερού διαπιστώνεται ότι για το θαλασσινό νερό οι τιμές των ανακτήσεων κυμάνθηκαν από 70.1 έως 100 %, για το νερό του ποταμού από 67.8 έως 97.4 % και για το νερό της λίμνης από 59.8 έως 94.8%. Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι στην περίπτωση του θαλασσινού νερού λόγω αλμυρότητας (3.6 % w/w αλμυρότητα) δεν προστέθηκε ποσότητα NaCl [316]. Από τα αποτελέσματα, παρατηρείται μια μικρή μείωση των τιμών (όχι ιδιαίτερα σημαντική) από το θαλασσινό στο λιμναίο νερό η οποία πιθανόν να οφείλεται στην αύξηση της οργανικής ύλης με την ίδια σειρά. Επιπλέον οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) κυμάνθηκαν από 2.1 έως 11.5 % στο

θαλασσινό νερό, από 5.1 έως 9.8 % νερό του ποταμού και από 2.6 έως 10.4 % στο νερό λίμνης. Παρόλα αυτά, η **DLLME-SFO** δεν επηρεάζεται σημαντικά από τους διαφορετικούς τύπους υδάτων που χρησιμοποιούνται. Στον Πίνακα 8.7 φαίνονται τα όρια ποσοτικοποιήσεις (LOQ_s), οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) και οι ανακτήσεις (R%) των αναλυτών για κάθε τύπο νερού σε συγκέντρωση 25 μg L⁻¹.

Πίνακα 8.7: Ανακτήσεις (R%), οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) και όρια ποσοτικοποίησης (LOQ_s) στο θαλασσινό, ποτάμιο και λιμναίο νερό.

Αναλύτες	Θαλασσινό νερό		Ποτάμιο νερό		Λιμναίο νερό	
	Ανάκτηση	LOQ	Ανάκτηση	LOQ	Ανάκτηση	LOQ
	(R%)	(ng L ⁻¹)	(R%)	(ng L ⁻¹)	(R%)	(ng L ⁻¹)
	(RSD %)		(RSD %)		(RSD %)	
E6300	87.3 (8.5)	400	79.8 (9.8)	400	77.9 (10.4)	400
E4360	70.1 (7.9)	200	67.8 (9.1)	200	59.8 (8.9)	200
HMS	100.0 (6.2)	300	97.4 (5.1)	400	94.8 (2.6)	400
OD-PABA	79.1 (2.3)	400	78.9 (7.8)	400	77.8 (4.1)	400
Octylsalicylate	98.0 (11.5)	800	95.8 (6.5)	800	94.1 (4.0)	800

8.2. Σύγκριση Των **DLLME** Και **DLLME-SFO** Μεθόδων

Στην παρούσα διατριβή αναλύθηκε το μίγμα των φίλτρων UV με δυο νέες αναλυτικές μεθόδους, την **DLLME** και την **DLLME-SFO**. Στόχος μας ήταν η σύγκριση των δυο μεθόδων, ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα αποτελέσματα. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία t, γνωστή και ως κατά ζεύγη δοκιμασία t (*paired t-test*) (Κεφάλαιο 3, ενότητα 3.2.1). Βασική προϋπόθεση εφαρμογής των δοκιμασιών t, σε περιπτώσεις σύγκρισης πειραματικών μέσων τιμών είναι η ομοσκεδαστικότητα των μετρήσεων, δηλαδή η μη σημαντική διαφορά στις σχετικές τυπικές αποκλίσεις (s) των μετρήσεων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που εξήχθησαν για τις δυο μεθόδους, **DLLME** και **DLLME-SFO**, η σύγκριση των τυπικών αποκλίσεων (s) (δοκιμασία F), πραγματοποιήθηκε με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις των μεθόδων για συγκέντρωση δείγματος 25 μg L⁻¹. Στον Πίνακα 8.8 παρουσιάζονται αναλυτικά οι συγκεντρώσεις των δυο μεθόδων για μια σειρά μετρήσεων του ίδιου δείγματος σε συγκέντρωση 25 μg L⁻¹.

Πίνακας 8.8: Δοκιμασία F για τις μεθόδους **DLLME και **DLLME-SFO**.**

N _o	DLLME (x _{ia}) (mg L ⁻¹)	DLLME-SFO (x _{ib}) (mg L ⁻¹)	(x _{ia} - $\bar{x}_a$)	(x _{ia} - $\bar{x}_a$) ²	(x _{ib} - $\bar{x}_b$)	(x _{ib} - $\bar{x}_b$) ²
1	0.0193	0.0228	-0.00118	1.39E-06	-0.00183	3.36576E-06
2	0.0223	0.0263	0.00182	3.31E-06	0.00171	2.90839E-06
3	0.0207	0.0231	0.000220	4.84E-08	-0.00156	2.44797E-06
4	0.0195	0.0241	-0.000981	9.604E-07	-0.000520	2.72067E-07
5	0.0206	0.0269	0.000120	1.44E-08	0.00222	4.908E-06
$\bar{x}_a = 0.0205$ $\bar{x}_b = 0.0246$ $\sum (x_i - \bar{x}_a)^2 = 5.72E - 06$ $\sum (x_i - \bar{x}_b)^2 = 1.39E - 05$						

Στη συνέχεια υπολογίσθηκαν οι διακυμάνσεις s_a και s_b για πέντε βαθμού ελευθερίας για κάθε περίπτωση ($v_a, v_b = 5$ που ορίζονται ως $N_a - 1 = 5 - 1 = 4$ και $N_b - 1 = 5 - 1 = 4$), σύμφωνα με τις παρακάτω σχέσεις 2 και 3:

$$s_a^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x}_a)^2}{N_a - 1} = \frac{5.72E - 06}{4} = 1.43E - 06 \quad (2)$$

και

$$s_b^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x}_b)^2}{N_b - 1} = \frac{1.39E - 05}{4} = 3.47E - 06 \quad (3)$$

ενώ η τιμή $F_{\text{πειραματική}}$ υπολογίσθηκε με βάση την παρακάτω σχέση 4:

$$F_{\text{πειραματική}} = \frac{s_b^2}{s_a^2} = \frac{3.47E - 06}{1.43E - 06} = 2.43 \quad (4)$$

Η τιμή $F_{\text{πειραματική}}$ στη συνέχεια συγκρίθηκε με την αντίστοιχη τιμή $F_{\text{θεωρητικό}}$, από τον Πίνακα 3.2 για διάστημα εμπιστοσύνης 95% και βρέθηκε $F_{\text{πειραματική}} = 2.43 < F_{\text{θεωρητικό}} = 5.05$, συμπεραίνοντας ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην επαναληψιμότητα των μεθόδων για το προαναφερθέν διάστημα εμπιστοσύνης.

Στη συνέχεια προχωράμε στην σύγκριση των δυο νέων αναλυτικών μεθόδων για μια σειρά δειγμάτων, που καλύπτουν μια σχετικώς ευρεία περιοχή τιμών. (δοκιμασία t). Στόχος είναι να προσδιορισθεί αν η **DLLME-SFO** μέθοδος δίνει σημαντικά διαφορετικά αποτελέσματα για μια σειρά δειγμάτων, εν συγκρίσει με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με την **DLLME** μέθοδο. Στον Πίνακα 8.9 παρουσιάζονται αναλυτικά οι μετρήσεις και οι υπολογισμοί που πραγματοποιήθηκαν για τις δυο μεθόδους.

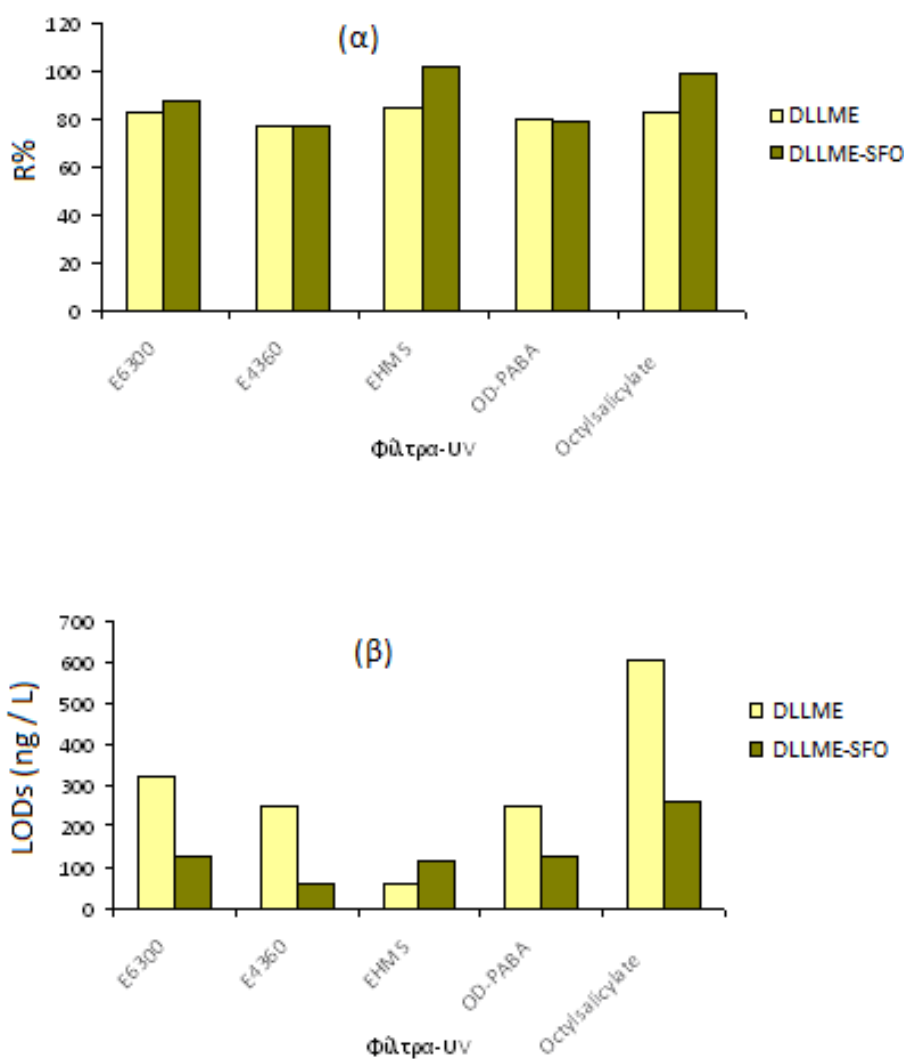
Πίνακας 8.9: Δοκιμασία-t για τις *DLLME* και *DLLME-SFO*.

No	DLLME-SFO (mg L ⁻¹)	DLLME (mg L ⁻¹)	d_i	$d_i - \bar{d}$	$(d_i - \bar{d})^2$	S_d	$t_{\text{πειραματικό}}$
1	0.001764	0.002132	-0.000370	-0.01519	0.0002310		
2	0.007166	0.003947	0.003219	-0.01160	0.0001350		
3	0.009111	0.008574	0.0005370	-0.01429	0.000204		
4	0.02308	0.02522	-0.002140	-0.01696	0.0002880	0.06520	0.6013
5	0.03485	0.04413	-0.009271	-0.02410	0.0005810		
6	0.04822	0.09411	-0.04590	-0.06072	0.003687		
7	0.4313	0.2736	0.1577	0.1429	0.02041		
$\bar{d} = 0.01482$					$\Sigma = 0.02553$		

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.1, η τιμή t ($t_{\text{θεωρητικό}}$) για διάστημα εμπιστοσύνης 95% και για 6 βαθμούς ελευθερίας είναι 2.45. Επομένως, $t_{\text{πειραματικό}} < t_{\text{θεωρητικό}}$ ($0.6013 < 2.45$) συμπεραίνοντας ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο μεθόδων (*DLLME* και *DLLME-SFO*) για το προαναφερθέν διάστημα εμπιστοσύνης. Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι μια δοκιμασία με στάθμη εμπιστοσύνης 95% θεωρείται στατιστικά σημαντική, αυτό σημαίνει ότι όσο μικρότερη είναι η τιμή του $t_{\text{πειραματικό}}$ τόσο πιο σίγουροι είμαστε ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο μεθόδων [294].

Η σύγκριση των δυο μεθόδων, με τις δυο προαναφερθείσες δοκιμασίες (F και t) επισήμανε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Με βάση την πειραματική διαδικασία, η *DLLME-SFO* μέθοδος όμως πλεονεκτεί έναντι της *DLLME*. Στην *DLLME-SFO*, οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες εκχύλισης (π.χ. 1-DD-OH, 1-UD-OH) χαρακτηρίζονται ως διαλύτες μικρής τοξικότητας έναντι των διαλυτών εκχύλισης της *DLLME* (π.χ. CCl_4 , C_2Cl_4). Για αυτό τον λόγο η *DLLME-SFO* καθίσταται περιβαλλοντικά

φιλικότερη εν συγκρίσει με την **DLLME**. Επιπλέον, στην **DLLME-SFO** ο διαλύτης εκχύλισης απομακρύνεται ευκολότερα από την υδατική φάση με το στάδιο της στερεοποίησης του, λαμβάνοντας υψηλότερες τιμές ανακτήσεων (R%) και χαμηλότερα όρια ανίχνευσης (LOD_s) όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 36.



Σχήμα 36: Σύγκριση των **DLLME** και **DLLME-SFO** μεθόδων για τα φίλτρα UV με βάση (α) την ανάκτηση (R%) και (β) τα όρια ανίχνευσης (LOD_s).

8.3. Βελτιστοποίηση Της Υγρής Υγρής Μικροεκχύλισης Διασποράς Βασιζόμενη Στην Στερεοποίηση Της Επιπλέουσας Οργανικής Φάσης (**DLLME-SFO**) Σε Επιφανειακά Ύδατα Για Τις PCMs Και Τους PAEs

8.3.1. Χρωματογραφική Τεχνική

Όπως αναφέρεται στο Κεφάλαιο 6, Ενότητα 6.2.1.

8.3.2. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς Βασιζόμενη Στην Στερεοποίηση Της Επιπλέουσας Οργανικής Φάσης (**DLLME-SFO**)

5 mL υδατικού δείγματος τοποθετούνται σε γυάλινο σωλήνα και προστίθεται το μίγμα των αναλυτών, σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Στο διάλυμα εμβολιάζεται το μίγμα των διαλυτών εκχύλισης και διασποράς (200 μL 1-UD-OH και 1.33 mL ακετόνης). Το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς, σχηματίζοντας πολλές μικρές σταγόνες (παρατηρείται ο σχηματισμός θολώματος), οι οποίες διασπείρονται σε όλη την επιφάνεια του διαλύματος, με τους αναλύτες να εκχυλίζονται εντός αυτών. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετείται στην φυγόκεντρο για 12 min στις 4000 στροφές (rpm). Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, στην επιφάνεια του υδατικού διαλύματος παρατηρείται να "επιπλέει" ο διαλύτης εκχύλισης (1-UD-OH), λόγω μικρότερης πυκνότητας από αυτής του νερού (Πίνακας 2.7). Η απομάκρυνση του από το υδατικό διάλυμα πραγματοποιείται με την στερεοποίηση του, φαινόμενο το οποίο οφείλεται στο χαμηλό σημείο τήξεως του (Πίνακας 2.7). Για να επιτευχθεί η ταχεία στερεοποίηση του, το διάλυμα τοποθετείται σε παγόλουτρο για 5 min και στη συνέχεια με τη βοήθεια μιας λαβίδας απομακρύνεται. Τέλος, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για λίγα λεπτά ώστε να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση και 2 μL εγχέονται εντός του GC-MS.

8.3.3. Πολυπαραγοντική Μέθοδος

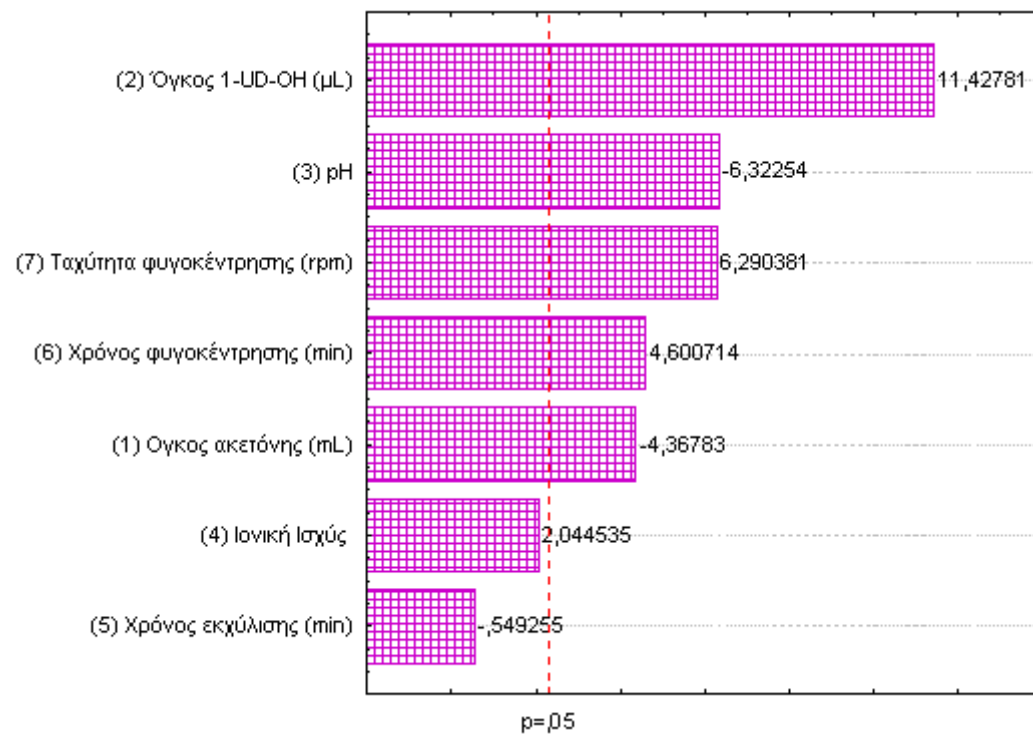
8.3.3.1. Σχεδιασμός Αξιολόγησης Plackett-Burman

Όπως και στην περίπτωση των φίλτρων UV έτσι και εδώ, εφαρμόστηκε ο πειραματικός σχεδιασμός αξιολόγησης Plackett–Burman 2^{7-4} . Οι παράγοντες που επιλεχθήκαν ήταν: ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης (μL), ο όγκος του διαλύτη διασποράς (mL), το pH, η ιοντική ισχύς (NaCl, w/v %), ο χρόνος εκχύλισης (min), ο χρόνος φυγοκέντρωσης (min) και η ταχύτητα φυγοκέντρωσης (rpm), ενώ ως απόκριση επιλέχθηκε η μέση τιμή των ανακτήσεων των αναλυτών για κάθε σειρά πειραμάτων (R%). Οι παράγοντες, οι κωδικοποιημένες τιμές και τα επίπεδα αυτών παρατίθενται στον Πίνακα 8.10.

Πίνακας 8.10: Οι πειραματικοί παράγοντες, οι κωδικοποιημένες τιμές, τα επίπεδα τιμών τους για τον πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman.

Παράγοντες	Κωδικοποιημένες τιμές	Επίπεδα	
		Χαμηλό (-1)	Υψηλό (+1)
Όγκος ακετόνης (mL)	X ₁	0.5	2.0
Όγκος 1-UD-OH (μL)	X ₂	40	200
pH	X ₃	3	11
Ιοντική ισχύς (NaCl w/v) (%)	X ₄	0	5
Χρόνος εκχύλισης (min)	X ₅	1	3
Χρόνος φυγοκέντρησης (min)	X ₆	2	10
Ταχύτητα φυγοκέντρησης (rpm)	X ₇	1000	4000

Σειρά	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	-1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1
10	-1	-1	-1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1
13	-1	-1	1	1	-1	-1	1
14	1	-1	1	-1	1	-1	-1
15	-1	1	1	-1	-1	1	-1
16	1	1	1	1	1	1	1



Σχήμα 37: Απεικόνιση του διαγράμματος Pareto για τον 2^{7-4} πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman.

Πίνακας 8.11. Αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για τον 2^{7-4} πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman.

	Επίδραση	Σταθερές	t	p
Αλληλεπίδραση	52.30	52.30	44.30	0.000000
X_1	-10.30	-5.16	-4.37	0.00239
X_2	26.90	13.50	11.40	0.000003
X_3	-14.90	-7.47	-6.32	0.000227
X_4	4.83	2.41	2.04	0.0751
X_5	-1.30	-0.65	-0.59	0.599
X_6	10.90	5.43	4.60	0.00175
X_7	14.90	7.43	6.29	0.000235

*Σταθερά προσδιορισμού $R^2 = 0.96957$

Στη συνέχεια βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 8.11) και το διάγραμμα Pareto (σχήμα 37) για το εκτιμώμενο μοντέλο, βρέθηκε ότι οι παράγοντες X_1 , X_2 , X_3 , X_6 και X_7 επηρεάζουν την ανάκτηση της μεθόδου ($p < 0.05$). Από αυτούς θετική επίδραση παρουσιάζουν ο όγκος της 1-UD-OH (X_2), η ταχύτητα φυγοκέντρωσης (X_7) και ο χρόνος φυγοκέντρωσης (X_6) ενώ το pH (X_3) και ο όγκος της ακετόνης (X_1) έχουν αρνητική επίδραση.

Η θετική επίδραση της ταχύτητας φυγοκέντρωσης (X_7) από το χαμηλό (-1) στο υψηλό (+1) επίπεδο τιμών ήταν ο λόγος ώστε η τιμή της να διατηρηθεί σταθερή (στις μέγιστες στροφές του οργάνου, 4000 rpm) αποκλείοντας την από το επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας. Αντίθετα, το pH του διαλύματος (X_3) παρουσίασε αρνητική επίδραση από το χαμηλό (-1) στο υψηλό (+1) επίπεδο τιμών. Είναι πιθανό, η αρνητική επίδραση του να οφείλεται στην υδρόλυση κάποιων ουσιών. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, οι PAEs υπόκεινται στην διαδικασία της υδρόλυσης. Ο

Peterson και η ομάδα του [44] έχουν αναφέρει ότι οι PAEs υφίστανται δυο στάδια υδρόλυσης. Στο πρώτο στάδιο σχηματίζεται ένας μόνο-εστέρας και μια αλκοόλη ενώ στο δεύτερο στάδιο το φθαλικό οξύ και μια αλκοόλη. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι PCMs, είναι ανθεκτικές σε αλκαλικό περιβάλλον. Τα παραπάνω δεδομένα ήταν αρκετά ώστε να αποκλειστεί από την μετέπειτα διαδικασία ο παράγοντας pH, διατηρώντας τον σταθερό στην τιμή 7.

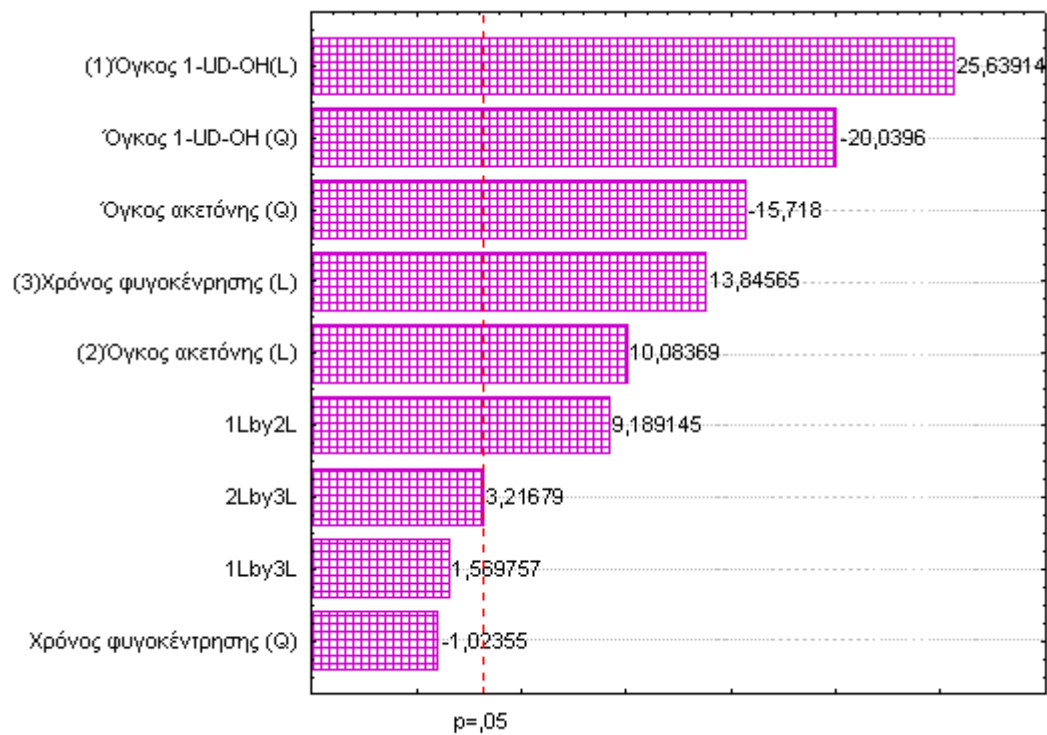
Καταλήγοντας, στο επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας οι παράγοντες που επιλέχθηκαν για περαιτέρω διερεύνηση ήταν ο όγκος της 1-UD-OH (X_2), ο όγκος της ακετόνης (X_1) και ο χρόνος φυγοκέντρησης (X_6) διατηρώντας την ταχύτητα φυγοκέντρησης στις 4000 rpm, το pH = 7, τον χρόνο της εκχύλισης στο 1 min (παρουσιάζει αρνητική επίδραση από το χαμηλό στο υψηλό επίπεδο τιμών) και 0 % w/v NaCl.

8.3.3.2. Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)

Στον Πίνακα 8.12 παρουσιάζεται αναλυτικά ο πειραματικός σχεδιασμός που εφαρμόστηκε.

Πίνακας 8.12: Σύνολο δεδομένων του Κεντρικού Σύνθετου Σχεδιασμού.

Παράγοντες	Επίπεδα			Κεντρικά σημεία ($\alpha = 1.682$)	
	Χαμηλό (-1)	Κεντρικό (0)	Υψηλό (+1)	- α	+ α
(X_1) Όγκος ακετόνης (mL)	0.60	1.00	1.40	0.32	1.67
(X_2) Όγκος 1-UD-OH (μ L)	90	150	210	49	250
(X_6) Χρόνος φυγοκεντρησης (min)	7.20	9.00	10.80	5.97	12.02
Σειρά	X_1	X_2	X_6	R %	
1	-1	-1	-1	69.2	
2	-1	-1	1	72.4	
3	-1	1	-1	62.4	
4	-1	1	1	74.5	
5	1	-1	-1	75.7	
6	1	-1	1	85.0	
7	1	1	-1	88.0	
8	1	1	1	99.4	
9	- α	0	0	54.6	
10	+ α	0	0	81.4	
11	0	- α	0	65.3	
12	0	+ α	0	79.0	
13	0	0	- α	78.6	
14	0	0	+ α	94.0	
15	0	0	0	88.2	
16	0	0	0	89.0	
17	0	0	0	90.0	
18	0	0	0	91.0	



Σχήμα 38: Απεικόνιση του διαγράμματος Pareto για το CCD.

Πίνακας 8.13: Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για τον προτεινόμενο πειραματικό σχεδιασμό.

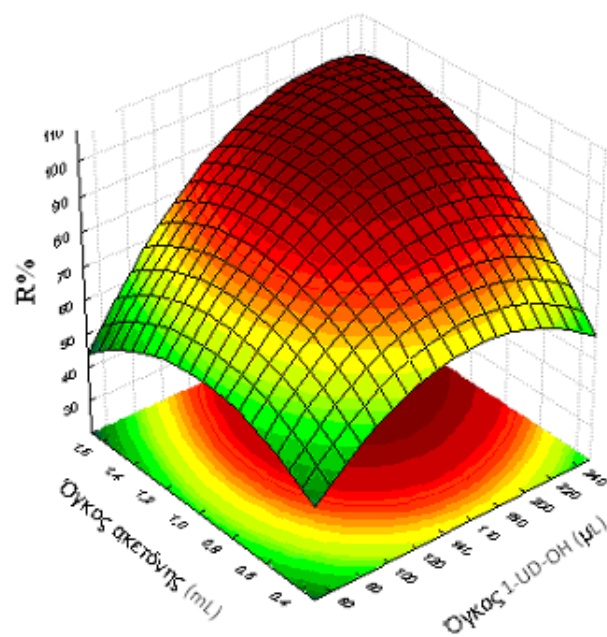
	SS	df	MS	F-τιμή	ρ-τιμή Πιθανότητα > F	Παρατηρήσεις
Μοντέλο	2488.65	9	276.52	188.63	< 0.0001	Σημαντική
X_1	963.63	1	963.63	657.37	0.0001	
X_2	149.05	1	149.05	101.68	0.0021	
X_6	281.02	1	281.02	191.70	0.0008	
X_1^2	588.69	1	588.69	401.59	0.0003	
X_2^2	362.21	1	362.21	247.06	0.0006	
X_6^2	1.54	1	1.54	1.05	0.3813	
1L2L	123.78	1	123.78	84.44	0.0027	
1L3L	3.61	1	3.61	2.46	0.2145	
2L3L	15.16	1	15.16	10.35	0.0487	
LOF	57.02	5	11.40	7.78	0.0609	Ασήμαντη
Σφάλμα	4.40	3	1.47			
Συνολικό SS	2432.10	17				

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 8.13) και το διάγραμμα Pareto (σχήμα 38) χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία και ερμηνεία των δεδομένων. Η τιμή του LOF δεν ήταν σημαντική με $p > 0.05$, ενώ η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 (0.9747) ήταν αρκετά ικανοποιητική εκφράζοντας ότι το 97.47% της διακύμανσης της απόκρισης μπορεί να ερμηνευτεί από το προτεινόμενο μοντέλο. Από το διάγραμμα Pareto διαπιστώνονται επιδράσεις πρώτου X_1 , X_2 , X_7 και δευτέρου βαθμού X_1^2 , X_2^2 και οι αλληλεπιδράσεις X_1X_2 «όγκος ακετόνης - όγκος 1-UD-OH» και X_2X_6 «όγκος 1-UD-OH - χρόνος φυγοκέντρωσης». Στο

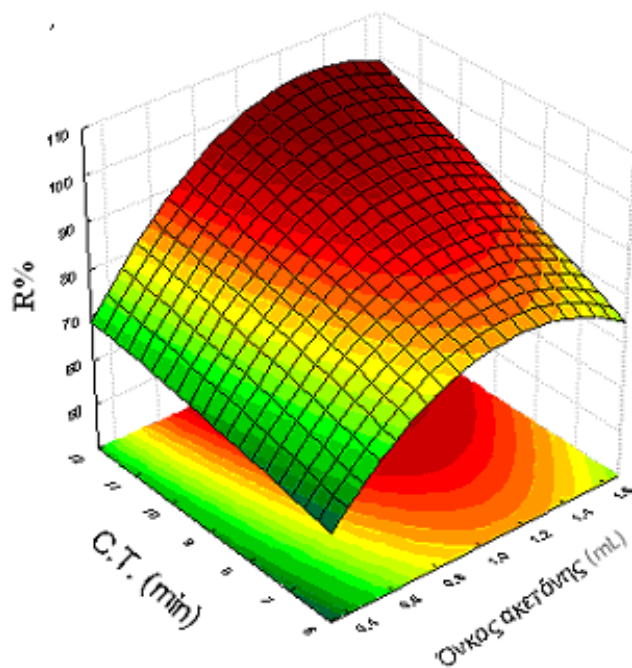
τελικό στάδιο του πειραματικού σχεδιασμού, μια δευτέρου βαθμού πολυωνυμική εξίσωση της ανάκτησης (R%) αναπτύχθηκε για να εκφράσει το προτεινόμενο μοντέλο (εξίσωση 34):

$$R\% = 89.40 + 8.40X_1 + 3.30X_2 + 4.54X_6 - 6.82X_1^2 - 5.35X_2^2 + 3.93X_1X_2 + 1.38X_2X_6 \quad (34)$$

όπου X_1 είναι ο όγκος της ακετόνης, X_2 είναι ο όγκος της 1-UD-OH και X_6 είναι ο χρόνος φυγοκέντρωσης. Το μοντέλο αποτελείται από τρεις κύριες επιδράσεις (X_1 , X_2 , X_6), δυο αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους προς ανάλυση παράγοντες (X_1X_2 , X_2X_6) και δυο επιδράσεις καμπυλότητας (X_1^2 και X_2^2). Στο σχήμα 39 απεικονίζονται σε τρισδιάστατη μορφή (3D) οι επιδράσεις των παραγόντων «όγκος 1-UD-OH - όγκος ακετόνης» (σχήμα 39α) και «όγκος ακετόνης - χρόνος φυγοκέντρωσης» (σχήμα 39β).



(α)



(β)

Σχήμα 39: Τρισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα (α) «όγκος ακετόνης-όγκος 1-UD-OH» και (β) «χρόνος φυγοκέντρησης - όγκος ακετόνης».

Σύμφωνα με το σχήμα 39α, για χαμηλό όγκο διαλύτη εκχύλισης (1-UD-OH) και διασποράς (ακετόνη) η ανάκτηση της μεθόδου ήταν χαμηλή ($R \sim 50\%$). Αυξάνοντας τον όγκο του διαλύτη διασποράς διατηρώντας σταθερό τον όγκο του διαλύτη εκχύλισης η ανάκτηση δεν παρουσίασε διαφορά και παρέμεινε σταθερή. Στην πρώτη περίπτωση, ο όγκος του διαλύτη διασποράς δεν ήταν αρκετός ώστε να διασπείρει κατάλληλα τον διαλύτη εκχύλισης εντός του υδατικού διαλύματος, ενώ στη δεύτερη περίπτωση η αύξηση του διαλύτη διασποράς είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της διαλυτότητας των αναλυτών εντός του υδατικού διαλύματος μειώνοντας έτσι την ανάκτηση της μεθόδου [277]. Στη συνέχεια η ταυτόχρονη αύξηση των όγκων της ακετόνης και της 1-UD-OH είχε σαν επακόλουθο την αύξηση του όγκου της επιπλέουσας φάσης (V_{floated}) οδηγώντας σε άνοδο της τιμής της ανάκτησης της μεθόδου. Περαιτέρω αύξηση του όγκου της 1-UD-OH διατηρώντας σταθερό τον όγκο της ακετόνης (1 έως 1.4 mL) δεν οδηγεί σε αύξηση της ανάκτησης συμπεραίνοντας ότι η εκχύλιση είναι ποσοτική [275].

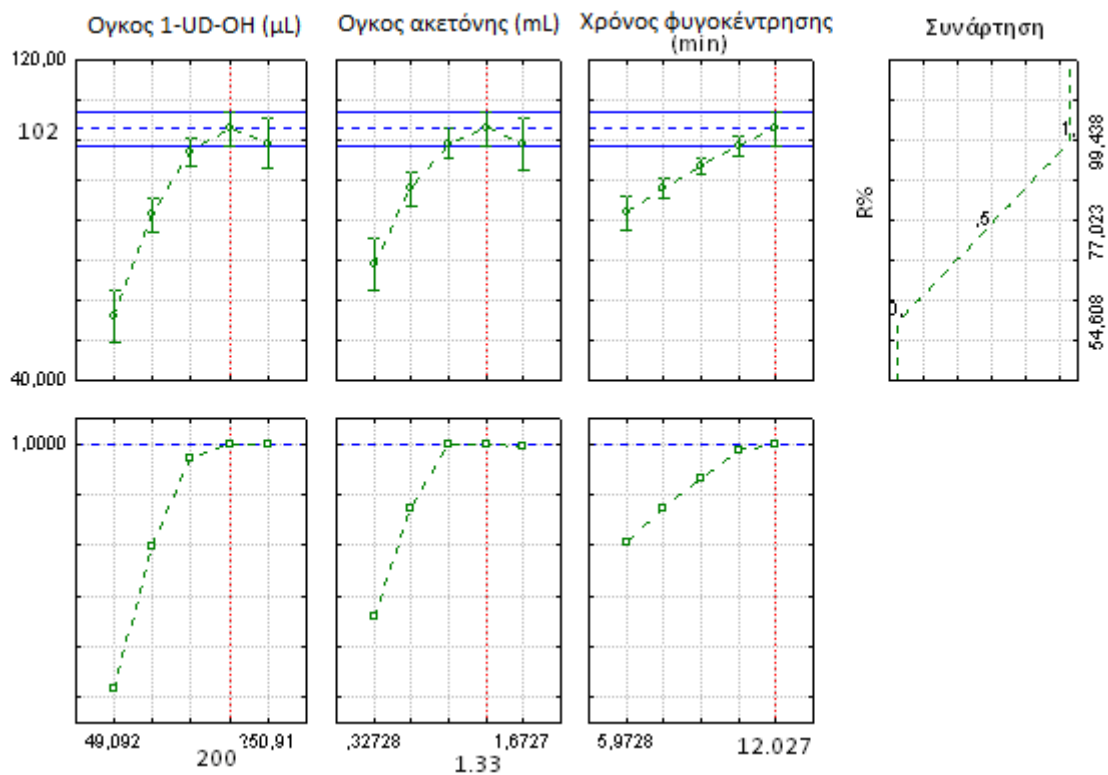
Στο δεύτερο διάγραμμα που παρατίθεται παραπάνω (σχήμα 39β) απεικονίζεται η αλληλεπίδραση ανάμεσα στον διαλύτη διασποράς (ακετόνη) και τον χρόνο φυγοκέντρησης (C.T). Από το διάγραμμα διαπιστώνεται χαμηλή ανάκτηση ($\sim 50\%$) όταν ο όγκος του διαλύτη διασποράς και ο χρόνος φυγοκέντρησης ήταν σε χαμηλά επίπεδα. Αύξηση της ανάκτησης παρατηρήθηκε όταν υπήρξε ταυτόχρονη αύξηση του όγκου της ακετόνης (1.2 έως 1.4 mL) και του χρόνου φυγοκέντρησης (10 έως 12 min), αυξάνοντας την επιφάνεια επαφής ανάμεσα στον διαλύτη διασποράς και το υδατικό διάλυμα. Με αυτό τον τρόπο οι σταγόνες του διαλύτη εκχύλισης διαχέονται κατάλληλα εντός του υδατικού διαλύματος εκχυλίζοντας ικανοποιητικά τους αναλύτες με ταυτόχρονη αύξηση του όγκου της επιπλέουσας φάσης [273]. Περαιτέρω αύξηση του όγκου της ακετόνης (1.6 mL) προκαλεί μείωση της ανάκτησης της μεθόδου. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η ακετόνη είναι αναμίξιμη με το νερό ενώ η 1-UD-OH έχει ορισμένη διαλυτότητα στην ακετόνη, υψηλές τιμές διαλύτη διασποράς αυξάνουν την διαλυτότητα της 1-UD-OH εντός του υδατικού διαλύματος

μειώνοντας τον όγκο της επιπλέουσας φάσης (V_{floated}). Εν κατακλείδι, η μέγιστη τιμή της ανάκτησης (~100%) παρατηρήθηκε όταν ο όγκος της ακετόνης ήταν σε ενδιάμεσες τιμές (1.0 – 1.4 mL) και ο χρόνος φυγοκέντρωσης σε υψηλές (10-12 min).

8.3.3.3. Βελτιστοποίηση Με Τη Μέθοδο Της Επιθυμητής Συνάρτησης (Desirability Function)

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα από το CCD σχέδιο (Πίνακας 8.12), η μέγιστη και ελάχιστη ανάκτηση (R%) που παρατηρήθηκε ήταν 99.4 % και 54.6 %, αντίστοιχα. Στα δεξιά του σχήματος 40 απεικονίζονται τα δεδομένα της επιθυμητής συνάρτησης για κάθε παράγοντα: η κωδικοποιημένη τιμή 1.0 εκφράζει τη μέγιστη ανάκτηση (99.4%), η 0.0 την ελάχιστη (54.6%) και 0.5 την ενδιάμεση (77.0%). Στο αριστερό κάτω τμήμα του σχήματος βρίσκονται οι βέλτιστες τιμές για κάθε μια παράμετρο ξεχωριστά σύμφωνα με τον μέσο όρο της ανάκτησης (R%).

Με βάση τους υπολογισμούς που πραγματοποιήθηκαν από το πρόγραμμα, η μέγιστη ανάκτηση (R%) της μεθόδου υπολογίστηκε στα 102.0 %, με τις βέλτιστες τιμές για κάθε παράμετρο να είναι 200 mL 1-UD-OH, 1.33 mL ακετόνης και 12 min ο χρόνος φυγοκέντρωσης. Για να επαληθευτούν οι παραπάνω τιμές πραγματοποιήθηκαν επαναληπτικά πειράματα με τις βέλτιστες συνθήκες. Οι τιμές των ανακτήσεων που ελήφθησαν ήταν αρκετά κοντά με την μέγιστη ανάκτηση που υπολογίστηκε από το πρόγραμμα.

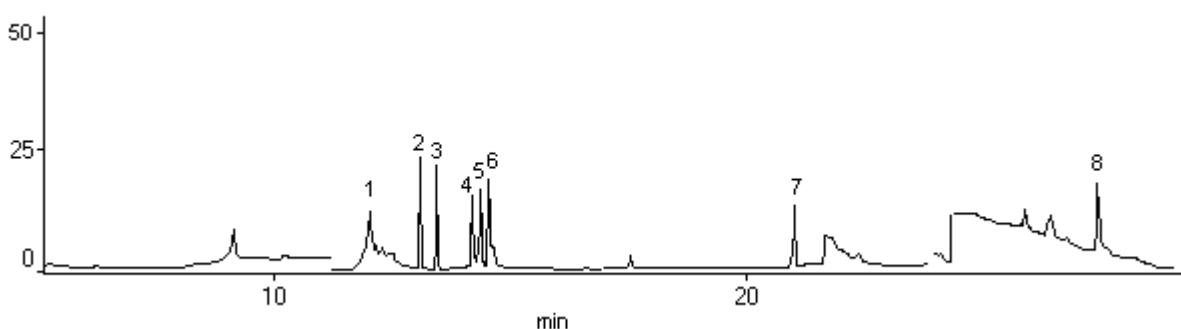


Σχήμα 40: Οι προβλεπόμενες τιμές για τις PCMs και τους PAEs.

8.3.4. Επικύρωση Της **DLLME-SFO** Μεθόδου

8.3.4.1. Γραμμικότητα, Πιστότητα Και Ευαισθησία Της Μεθόδου

Η επικύρωση της **DLLME-SFO** μεθόδου ελέγχθηκε σε νερό πηγής εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν, σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g L}^{-1}$ μίγματος. Στο σχήμα 41 φαίνεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος $25 \mu\text{g L}^{-1}$.



Σχήμα 41: Χρωματογράφημα GC-MS ύστερα από εκχύλιση με την μέθοδο **DLLME-SFO** των επιλεγμένων PCMs και PAEs σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g L}^{-1}$: (1) 1-UD-H, (2) ADBI, (3) AHMI, (4) ATII, (5) HHCB, (6) AHTN, (7) BBP, (8) DOP.

Η γραμμικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με τον υπολογισμό των σταθερών προσδιορισμού r^2 . Το εύρος γραμμικότητας των αναλυτών κυμάνθηκε μεταξύ του 0.21 έως $500.00 \mu\text{g L}^{-1}$, με τις σταθερές προσδιορισμού να κυμαίνονται από 0.9974 έως 0.9994 . Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) για την πιστότητα ($n=5 \times 3$ μέρες) και την ημερήσια πιστότητα ($n=15$ δείγματα) της μεθόδου δεν ξεπέρασαν το 13.4 και 4.8% , αντίστοιχα. Η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε μέσω των ορίων ανίχνευσης (LOD_s), τα οποία κυμάνθηκαν από 62.5 έως 500.0 ng L^{-1} για όλους τους αναλύτες. Στον Πίνακα 8.14 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα.

Πίνακας 8.14: Γραμμικότητα, επαναληψιμότητα, αναπαραγωγικότητα, όρια ανίχνευσης (LOD_s) και ανακτήσεις (R%) σε νερό πηγής με τη μέθοδο DLLME-SFO.

Αναλύτες	Γραμμικότητα ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Επαναληψι- μότητα (RSD %)	Αναπαραγω- γικότητα (RSD %)	LOD (ng L^{-1})	Ανάκτηση (R%) (RSD %)
ADBI	0.70-500.00	0.9994	4.8	2.9	200.0	97.8 (3.0)
AHMI	0.85-500.00	0.9993	1.6	4.5	250.0	101 (4.3)
ATII	1.70-500.00	0.9994	3.3	10.1	500.0	99.0 (4.9)
HHCB	0.85-500.00	0.9990	2.8	12.1	250.0	118 (11.7)
AHTN	0.50-500.00	0.9993	2.5	7.0	150.0	103 (5.2)
BBP	0.41-500.00	0.9974	1.9	13.4	125.0	97.3 (2.2)
DOP	0.21-500.00	0.9991	2.5	3.6	62.5	96.1 (8.5)

8.3.4.2. Δείγματα Νερού

Μετά τα στάδια βελτιστοποίησης και επικύρωσης, η προτεινόμενη μέθοδος εφαρμόστηκε σε τρεις διαφορετικούς τύπους υδάτων (θαλασσινό, ποτάμιο και λιμναίο). Αρχικά τα δείγματα ελέχθησαν για τυχόν υπολείμματα PCMs ή PAEs και βρέθηκαν να είναι καθαρά. Οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν σε ικανοποιητικά επίπεδα για όλους τους τύπους υδάτων, από 94.8-101.5 % για το θαλασσινό, από 90.8-99.1% για το ποτάμιο και από 88.4-96.7% για το λιμναίο νερό. Οι παρατηρούμενες διαφορές στις ανακτήσεις είναι πολύ μικρές αποδεικνύοντας ότι υποστρώματα αυτού του τύπου δεν επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της **DLLME-SFO** μεθόδου. Στον Πίνακα 8.15 απεικονίζονται τα όρια ποσοτικοποιήσεις (LOQ_s), οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD %) και οι ανακτήσεις (R%) των αναλυτών για κάθε τύπο νερού σε συγκέντρωση 25 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Πίνακας 8.15: Ανακτήσεις (R%), οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) και όρια ποσοτικοποίησης (LOQ_s) στο θαλασσινό και ποτάμιο νερό.

Αναλύτες	Θαλασσινό νερό		Ποτάμιο νερό		Λιμναίο νερό	
	Ανάκτηση	LOQ	Ανάκτηση	LOQ	Ανάκτηση	LOQ
	(R%)	(ng L ⁻¹)	(R%)	(ng L ⁻¹)	(R%)	(ng L ⁻¹)
	(RSD %)		(RSD %)		(RSD %)	
ADBI	96.6 (9.8)	674	95.7 (3.9)	681	93.6 (4.1)	694
AHMI	98.6 (6.1)	853	97.4 (3.1)	862	95.8 (4.8)	876
ATII	98.5 (9.5)	1674	92.9 (11.7)	1768	90.4 (3.1)	1809
HHCB	101.5 (7.0)	969	99.1 (2.8)	988	96.7 (8.6)	1009
AHTN	100.5 (5.9)	510	95.9 (5.2)	533	93.6 (5.5)	545
BBP	95.7 (9.9)	419	90.8 (5.4)	431	88.4 (6.5)	455
DOP	94.8 (7.1)	227	91.5 (4.0)	231	89.6 (8.4)	242

8.4. Σύγκριση Των **DLLME** Και **DLLME-SFO** Μεθόδων

Το μίγμα των PCMs και των PAEs αναλύθηκε με τις δυο νέες αναλυτικές μεθόδους, την **DLLME** και την **DLLME-SFO**, που αναπτύχθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Στόχος μας, είναι η σύγκριση των δυο μεθόδων, η οποία θα πραγματοποιηθεί με τη δοκιμασία-F και τη δοκιμασία-t (Κεφάλαιο 8, Ενότητα 8.1.6).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των δυο μεθόδων (**DLLME** και **DLLME-SFO**), η σύγκριση των τυπικών αποκλίσεων (διακυμάνσεις s) (δοκιμασία F), θα πραγματοποιηθεί με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις των μεθόδων για συγκέντρωση δείγματος $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Στον Πίνακα 8.16 παρουσιάζονται αναλυτικά οι συγκεντρώσεις των δυο μεθόδων για μια σειρά μετρήσεων του ίδιου δείγματος σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g L}^{-1}$, οι διακυμάνσεις s_a και s_b για πέντε βαθμούς ελευθερίας καθώς και η τιμή που υπολογίσθηκε για το $F_{\text{πειραματική}}$.

Πίνακας 8.16: Δοκιμασία F για τις μεθόδους **DLLME και **DLLME-SFO**.**

N _o	DLLME	DLLME-SFO	$(x_{ia} - \bar{x}_a)$	$(x_{ia} - \bar{x}_a)^2$	$(x_{ib} - \bar{x}_b)$	$(x_{ib} - \bar{x}_b)^2$	S _a	S _b	F _{πειραματική}
	(x _{ia})	(x _{ib})							
	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)							
1	0.0178	0.0178	-0.0027	7.30E-06	-0.0008	6.91E-07			
2	0.0198	0.0170	-0.0007	4.51E-07	-0.0016	2.52E-06			
3	0.0199	0.0182	-0.0006	3.90E-07	-0.0004	1.95E-07	4.53	2.23	2.03
4	0.0235	0.0209	0.0030	8.99E-06	0.0023	5.19E-06	E-06	E-06	
5	0.0215	0.0192	0.0010	9.97E-07	0.0006	3.35E-07			
$\bar{x}_a = 0.0205$ $\bar{x}_b = 0.0186$ $\sum (x_i - \bar{x}_a)^2 = 1.81E-05$ $\sum (x_i - \bar{x}_b)^2 = 8.92E-06$									

Με βάση τον Πίνακα 3.2 η τιμή $F_{\text{θεωρητικό}}$, για διάστημα εμπιστοσύνης 95%, είναι 5.05 συνάγοντας το συμπέρασμα ότι $F_{\text{πειραματική}} < F_{\text{θεωρητικό}}$ ($2.03 < 5.05$). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι οι δυο μέθοδοι δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στην επαναληψιμότητα ενώ είναι εξίσου ακριβείς.

Στη συνέχεια προχωράμε στη δοκιμασία-t, όπου στον Πίνακα 8.17 παρουσιάζονται αναλυτικά οι μετρήσεις και οι υπολογισμοί που πραγματοποιήθηκαν για τις δυο μεθόδους σε μια ευρεία περιοχή τιμών.

Πίνακας 8.17: Δοκιμασία-t για τις *DLLME* και *DLLME-SFO*.

No	DLLME-SFO (mg L ⁻¹)	DLLME (mg L ⁻¹)	d_i	$d_i - \bar{d}$	$(d_i - \bar{d})^2$	s_d	$t_{\text{πειραματικό}}$
1	0.0103	0.0113	-0.001	-0.0247	0.0006		
2	0.0182	0.0253	-0.0071	-0.0309	0.0009		
3	0.0411	0.0459	-0.0049	-0.0287	0.0008	0.054	0.97
4	0.0628	0.0511	0.0117	-0.0121	0.00015		
5	0.5463	0.4261	0.1202	0.0964	0.0093		
			$\bar{d} = 0.0237$		$\Sigma = 0.0118$		

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.1, η τιμή t ($t_{\text{θεωρητικό}}$) για διάστημα εμπιστοσύνης 95% και για 4 βαθμούς ελευθερίας είναι 2.78. Επομένως, $t_{\text{πειραματικό}} < t_{\text{θεωρητικό}}$ ($0.97 < 2.78$) συμπεραίνοντας ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο μεθόδων, *DLLME* και *DLLME-SFO*, για διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

Η σύγκριση των δυο μεθόδων, με τις δυο προαναφερθείσες δοκιμασίες (F και t) επισήμανε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Με βάση την πειραματική διαδικασία, η *DLLME-SFO* μέθοδος όμως πλεονεκτεί έναντι της *DLLME* όπως αναφέραμε και στην περίπτωση των φίλτρων UV (Κεφάλαιο 8, Ενότητα 8.1.6).

Το μόνο μειονέκτημα της **DLLME-SFO** μεθόδου που παρατηρήθηκε στην περίπτωση του μίγματος PCMs και PAEs ήταν τα υψηλότερα όρια ανίχνευσης (LOD_s) συγκριτικά με αυτά που προσδιορίστηκαν από την **DLLME**. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στο ότι δεν ήταν δυνατή η συμπύκνωση του διαλύτη εκχύλισης (1-UD-OH), όπως έγινε στην περίπτωση της **DLLME**. Καταλήγοντας, στη **DLLME-SFO** μέθοδο οι τιμές των ανακτήσεων (R%) βρέθηκαν να είναι υψηλές, ενώ οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) ήταν χαμηλότερες εν σύγκριση με τη **DLLME**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ
ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ-ΥΓΡΗΣ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ
ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΤΗΝ ΣΤΕΡΕΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ
ΕΠΙΠΛΕΟΥΣΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ (DLLME-SFO)
ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΥΔΑΤΑ ΚΑΙ ΕΔΑΦΗ ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΦΙΛΤΡΩΝ
UV, PCMs ΚΑΙ PAEs ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ
ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ.**

9.1. Εισαγωγή

Στα κεφάλαια που προηγήθηκαν (6^ο, 7^ο και 8^ο), αναπτύχθηκαν λεπτομερώς οι δυο νέες αναλυτικές μέθοδοι, **DLLME** και **DLLME-SFO**. Αυτές εφαρμόστηκαν σε διαφορετικά μίγματα αναλυτών, με διαφορετικές χρωματογραφικές τεχνικές (HPLC/UV-DAD και GC-MS) και σε διαφορετικά υποστρώματα (επιφανειακά ύδατα και εδάφη). Εν συνέχεια, οι δυο μέθοδοι συγκρίθηκαν με τη βοήθεια των δοκιμασιών F και t καταλήγοντας, όπως αναφέραμε και στο Κεφάλαιο 8, στην υπεροχή της **DLLME-SFO** έναντι της **DLLME**. Τα βασικά πλεονεκτήματα που παρατηρήθηκαν ήταν η χρήση διαλυτών χαμηλής τοξικότητας και επικινδυνότητας καθώς και η ευκολότερη και χωρίς απώλειες απομάκρυνση των διαλυτών εκχύλισης επιτυγχάνοντας υψηλότερες τιμές ανακτήσεων.

Οι προαναφερθέντες λόγοι ήταν αρκετοί ώστε να επιλεχθεί και να εφαρμοστεί η **DLLME-SFO** σε ένα συνολικό μίγμα αναλυτών (φίλτρα UV, PCMs και PAEs) με βασικό στόχο την βελτιστοποίηση και την εφαρμογή της, όπως θα δούμε αναλυτικά και στο Κεφαλαίο 10, στις Μονάδες Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων (ΜΕΥΑ) της πόλης των Ιωαννίνων με στόχο την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των αναλυτών σε αστικά υγρά και στερεά απόβλητα.

9.2. Χρωματογραφική Τεχνική

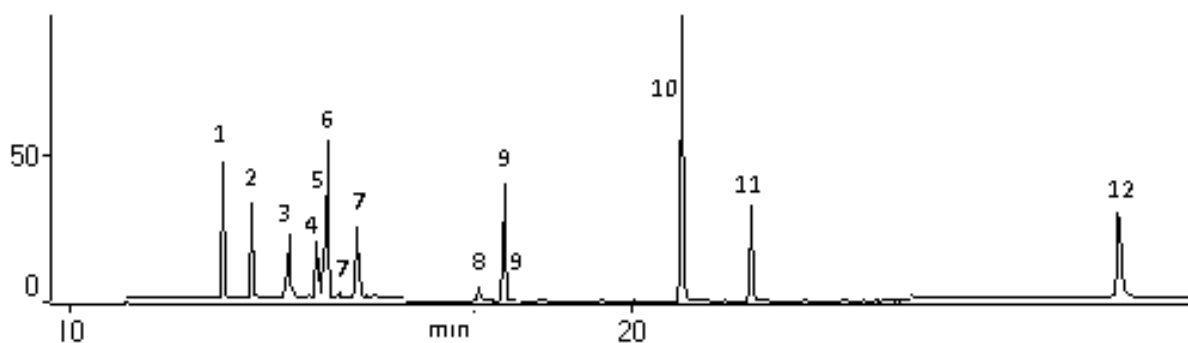
Για την ταυτοποίηση και τον διαχωρισμό του νέου μίγματος αναλυτών με την **DLLME-SFO** μέθοδο, χρησιμοποιήθηκε Αέριος Χρωματογράφος συζευγμένος με Φασματογράφο Μάζας (GC-MS). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της στήλης που χρησιμοποιήθηκε ήταν: αρχική θερμοκρασία 50°C για 2 min, άνοδος της θερμοκρασίας στους 190°C με ρυθμό ανόδου 20°C min⁻¹, στη συνέχεια άνοδος της θερμοκρασίας στους 270°C με ρυθμό ανόδου 5°C min⁻¹ και παραμονή στην τελική θερμοκρασία για 5min. Η θερμοκρασία της πηγής των ιόντων ρυθμίστηκε στους 280°C και τα φάσματα ελήφθησαν στα 70eV. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με καμπύλη αναφοράς 6 σημείων, από πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης

στον διαλύτη εκχύλισης σε συνάρτηση με (1-DD-OH) τα εμβαδά των κορυφών των αντίστοιχων αναλυτών (οι καμπύλες αναφοράς επαναλαμβάνονταν κάθε μέρα). Η γραμμικότητα των καμπυλών αναφοράς ελέγχθηκε για την περιοχή συγκεντρώσεων από 0.1 ως 10 mg L⁻¹. Σε όλες τις περιπτώσεις οι συντελεστές συσχέτισης κυμάνθηκαν πάνω από 0.9938. Στον Πίνακα 9.1 παρουσιάζονται οι χρόνοι κατακράτησης (t_R) και τα επιλεγμένα ιόντα για κάθε αναλύτη.

Πίνακας 9.1: Χρόνοι κατακράτησης (t_R , min), ιόντα ποσοτικοποίησης και ταυτοποίησης που προσδιορίζονται με τη χρήση GC-MS.

Αναλύτες	t_R (min)	Ιόντα ποσοτικοποίησης (m/z)	Ιόντα ταυτοποίησης (m/z)
ADBI	12.41	229	173, 244
AHMI	12.90	229	187, 244
Octylsalicylate	13.91	120	138, 152, 250
ATII	14.01	215	173, 258
HHCB	14.13	213	243, 258
AHTN	14.20	149	187, 243, 258
HMS	15.10	120	138, 262
	15.40	195	319
E4360	17.27	227	151, 228
E6300	17.60, 17.71	254	128, 211
OD-PABA	20.88	165	148, 277
BBP	21.63	206	191
DOP	27.97	279	57

Στο σχήμα 42 παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα του συνολικού μίγματος σε συγκέντρωση 5 mg L^{-1} .



Σχήμα 42: Χρωματογράφημα GC-MS του μίγματος των αναλυτών σε συγκέντρωση 5 mg L^{-1} :
(1) ADBI, (2) AHMI, (3) Octylsalicylate, (4) ATII, (5) HHCB, (6) AHTN, (6) BBP, (7) HMS, (8) E4360, (9) E6300, (10) OD-PABA, (11) BBP, (12) DOP.

9.3. Εφαρμογή Της **DLLME-SFO** Μεθόδου Σε Επιφανειακά Ύδατα

9.3.1. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς Βασιζόμενη Στην Στερεοποίηση Της Επιπλέουσας Οργανικής Φάσης (**DLLME-SFO**)

5 mL υδατικού δείγματος τοποθετούνται σε γυάλινο φυγοκεντρικό σωλήνα εισάγοντας 0.25 gr NaCl και το μίγμα των αναλυτών σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Στο διάλυμα εγχέεται το μίγμα των διαλυτών εκχύλισης και διασποράς (250 μL 1-DD-OH και 0.65 mL ακετόνης). Το διάλυμα αναδεύεται ελαφρώς, σχηματίζοντας πολλές μικρές σταγόνες (παρατηρείται ο σχηματισμός θολώματος), οι οποίες διασπείρονται σε όλη την επιφάνεια του διαλύματος, με τους αναλύτες να εκχυλίζονται εντός αυτών. Στην συνέχεια το διάλυμα τοποθετείται στην φυγόκεντρο για 5 min στις 4000 στροφές (rpm). Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, στην επιφάνεια του υδατικού διαλύματος παρατηρείται να "επιπλέει" ο διαλύτης εκχύλισης (1-DD-OH), λόγω μικρότερης πυκνότητας από αυτής του νερού (Πίνακας 2.7). Η απομάκρυνση του από το υδατικό διάλυμα πραγματοποιείται με την στερεοποίηση του, φαινόμενο το οποίο οφείλεται στο χαμηλό σημείο τήξεως του (Πίνακας 2.7). Για να επιτευχθεί η ταχεία στερεοποίηση του, το διάλυμα τοποθετείται σε παγόλουτρο για 5 min και στη συνέχεια με τη βοήθεια μιας λαβίδας απομακρύνεται. Τέλος, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για λίγα λεπτά ώστε να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση και 2 μL εγχέονται εντός του GC-MS.

9.3.2 Προκαταρκτικά Πειράματα

Οι διαλύτες εκχύλισης και διασποράς που ελέγχθησαν ήταν: 1-ενδεκανόλη (1-UD-OH), 1-δωδεκανόλη (1-DD-OH), η μεθανόλη (MeOH) και η ακετόνη (Ac). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων, όταν χρησιμοποιήθηκε η 1-UD-OH ως διαλύτης εκχύλισης παρατηρήθηκαν υψηλές τιμές ανακτήσεων για τις PCMs και χαμηλές για τους PAEs και τα φίλτρα UV. Αντίθετα, στη περίπτωση της 1-DD-OH τα συμπεράσματα που εξήχθησαν ήταν αντίστροφα. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν ήταν τα αναμενόμενα, καθώς και στις περιπτώσεις των δυο ξεχωριστών μιγμάτων

είχαν παρατηρηθεί ανάλογα αποτελέσματα. Η τελική επιλογή του διαλύτη εκχύλισης στηρίχθηκε στο πλήθος των αναλυτών που παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές ανακτήσεων.

Στην περίπτωση του διαλύτη διασποράς, η ακετόνη κρίθηκε ως ο καταλληλότερος διαλύτης. Στο συμπέρασμα αυτό καταλήξαμε καθώς ο όγκος της επιπλέουσας φάσης ήταν υψηλότερος χρησιμοποιώντας ακετόνη έναντι της μεθανόλης και κατά συνέπεια και η ανάκτηση της μεθόδου. Εν κατακλείδι, η 1-DD-OH επιλέχθηκε ως διαλύτης εκχύλισης και η ακετόνη ως διαλύτης διασποράς.

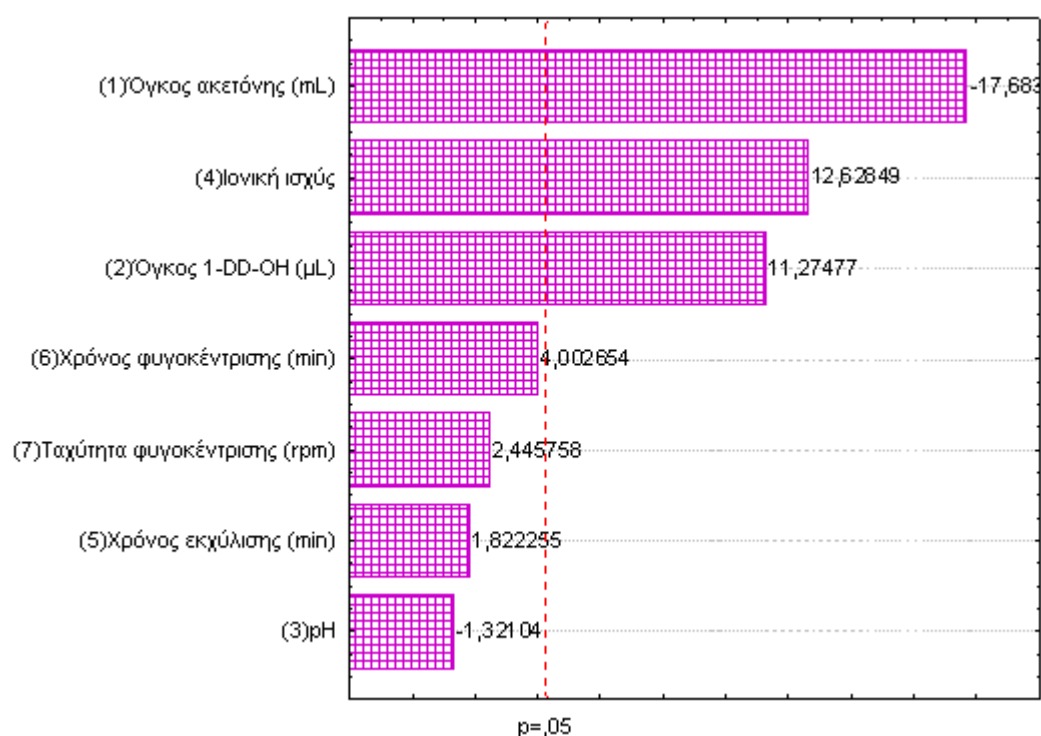
9.3.3. Πολυπαραγοντική Μέθοδος

9.3.3.1. Σχεδιασμός Αξιολόγησης Plackett-Burman

Ο 2^{7-4} πειραματικός σχεδιασμός αξιολόγησης Plackett–Burman επιλέχθηκε ώστε να προσδιορισθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόκριση της μεθόδου. Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν είναι: ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης (μL), ο όγκος του διαλύτη διασποράς (mL), το pH, η ιοντική ισχύς (NaCl, w/v %), ο χρόνος εκχύλισης (min), ο χρόνος φυγοκέντρωσης (min) και η ταχύτητα φυγοκέντρωσης (rpm) ενώ ως απόκριση επιλέχθηκε η μέση τιμή των ανακτήσεων των αναλυτών για κάθε σειρά πειραμάτων (R%). Οι παράγοντες και οι κωδικοποιημένες τιμές παρατίθενται στον Πίνακα 9.2.

Πίνακας 9.2: Οι πειραματικοί παράγοντες, οι κωδικοποιημένες τιμές, τα επίπεδα τιμών τους για τον πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman.

Παράγοντες	Κωδικοποιημένες τιμές	Επίπεδα		
		Χαμηλό (-1)	Κεντρικό (0)	Υψηλό (+1)
Όγκος ακετόνης (mL)	X ₁	0.50	1.25	2.00
Όγκος 1-DD-OH (μL)	X ₂	40	120	200
pH	X ₃	3	7	11
Ιοντική ισχύς (NaCl w/v %)	X ₄	0.0	2.5	5.0
Χρόνος εκχύλισης (min)	X ₅	1	2	3
Χρόνος φυγοκέντρωσης (min)	X ₆	2	6	10
Ταχύτητα φυγοκέντρωσης (rpm)	X ₇	1000	2500	4000



Σχήμα 43: Απεικόνιση του διαγράμματος Pareto για τον 2^{7-4} πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman.

Πίνακας 9.3. Αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για τον 2^{7-4} πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman.

	Επίδραση	Σταθερές	t	p
Αλληλεπίδραση	52.61	52.61	61.25	0.0002
X_1	-30.37	-15.19	-17.68	0.0032
X_2	19.37	9.68	11.27	0.0078
X_3	-2.27	-1.13	-1.32	0.3174
X_4	21.69	10.85	12.63	0.0062
X_5	3.13	1.56	1.82	0.2099
X_6	6.88	3.44	4.00	0.0571
X_7	4.20	2.10	2.45	0.1343

* Σταθερά προσδιορισμού $R^2 = 0.9974$

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 9.3) και το διάγραμμα Pareto (σχήμα 43), βρέθηκε ότι οι παράγοντες X_1 , X_2 και X_4 επηρεάζουν την ανάκτηση της μεθόδου ($p < 0.05$). Όπως διαπιστώνεται, ο πιο σημαντικός παράγοντας είναι ο όγκος της ακετόνης (X_1) παρουσιάζοντας όμως αρνητική επίδραση από το χαμηλό (-1) στο υψηλό (+1) επίπεδο τιμών. Αμέσως επόμενος παράγοντας είναι η ιοντική ισχύς (X_4) και ακολουθεί ο όγκος της 1-DD-OH (X_2), επιδρώντας και οι δυο θετικά. Ο χρόνος φυγοκέντρωσης (X_6), η ταχύτητα φυγοκέντρωσης (X_7) και ο χρόνος της εκχύλισης (X_5) παρουσιάζουν θετική αλλά όχι σημαντική επίδραση ενώ η επίδραση του pH (X_3) είναι αρνητική.

Καταλήγοντας, στο επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας μελετήθηκαν ο όγκος της ακετόνης (X_1), ο όγκος της 1-DD-OH (X_2) και η ιοντική ισχύς (X_4), διατηρώντας την ταχύτητα φυγοκέντρωσης στις 4000 rpm, το χρόνο φυγοκέντρωσης στα 10 min, το pH = 7 και τον χρόνο της εκχύλισης στα 3 min.

9.3.3.2. Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)

Ένας 2^3 κλασματικός πειραματικός σχεδιασμός εφαρμόστηκε, στην παρούσα πειραματική διαδικασία. Σε αυτή την περίπτωση ως μετρήσιμη απόκριση επιλέχθηκε αρχικά η μέση τιμή των ανακτήσεων των αναλυτών για κάθε σειρά πειραμάτων (R%) και μετέπειτα η σχετική τυπική απόκλιση της μέσης τιμής των ανακτήσεων. Ο λόγος που επιλέχθηκαν δυο τρόποι υπολογισμού της ανάκτησης θα αναφερθεί αναλυτικά παρακάτω. Οι παράγοντες, τα επίπεδα τιμών και τα δεδομένα που προέκυψαν από τις πειραματικές μετρήσεις των τριών μεταβλητών παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.4.

Πίνακας 9.4: Σύνολο δεδομένων του Κεντρικού Σύνθετου Σχεδιασμού.

Παράγοντες	Επίπεδα			Κεντρικά σημεία ($\alpha = 1.682$)	
	Χαμηλό (-1)	Κεντρικό (0)	Υψηλό (+1)	- α	+ α
(X_2) Όγκος 1-DD-OH (μL)	90	150	210	49	251
(X_1) Όγκος ακετόνης (mL)	1.00	1.50	2.00	0.66	2.34
(X_4) Ιοντική ισχύς (NaCl, w/v %)	1.50	2.50	3.50	0.81	4.18
Σειρά	X_2	X_1	X_4	R%	RSD%
1	-1	-1	-1	48.9	25.6
2	-1	-1	1	59.2	20.7
3	-1	1	-1	61.3	31.5
4	-1	1	1	75.1	28.3
5	1	-1	-1	71.2	16.9
6	1	-1	1	82.0	31.9
7	1	1	-1	64.3	17.8
8	1	1	1	62.7	24.3
9	-1.682	0	0	65.0	39.8
10	+1.682	0	0	82.2	17.7
11	0	-1.682	0	59.7	17.9
12	0	+1.682	0	64.1	24.3
13	0	0	-1.682	62.0	18.8
14	0	0	+1.682	64.1	23.3
15	0	0	0	72.0	32.7
16	0	0	0	77.0	35.0
17	0	0	0	78.1	33.1
18	0	0	0	76.0	37.0

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, η βελτιστοποίηση μια αναλυτικής μεθόδου αποσκοπεί στην επίτευξη υψηλών ανακτήσεων. Στην παρούσα φάση της Διδακτορικής Διατριβής η βελτιστοποίηση της **DLLME-SFO** μεθόδου, στόχευε σε ένα **συνολικό** μίγμα αναλυτών. Γι αυτό το λόγω, πραγματοποιήθηκε η επιλογή δυο μετρήσιμων αποκρίσεων, της R% και της RSD, για το σύνολο των αναλυτών ώστε να αποφευχθεί η επιλογή βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης που θα μπορούσαν να είναι παραπλανητικές για το σύνολο των αναλυτών. Λαμβάνοντας έτσι υπόψη την σχετική τυπική απόκλιση, ώστε αυτή να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη, προσπαθήσαμε να αποφύγουμε τέτοιες καταστάσεις [318]. Στον Πίνακα 9.5 παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης της διακύμανσης (ANOVA) στην περίπτωση που ως απόκριση έχει επιλεγεί η μέση τιμή της ανάκτηση της μεθόδου.

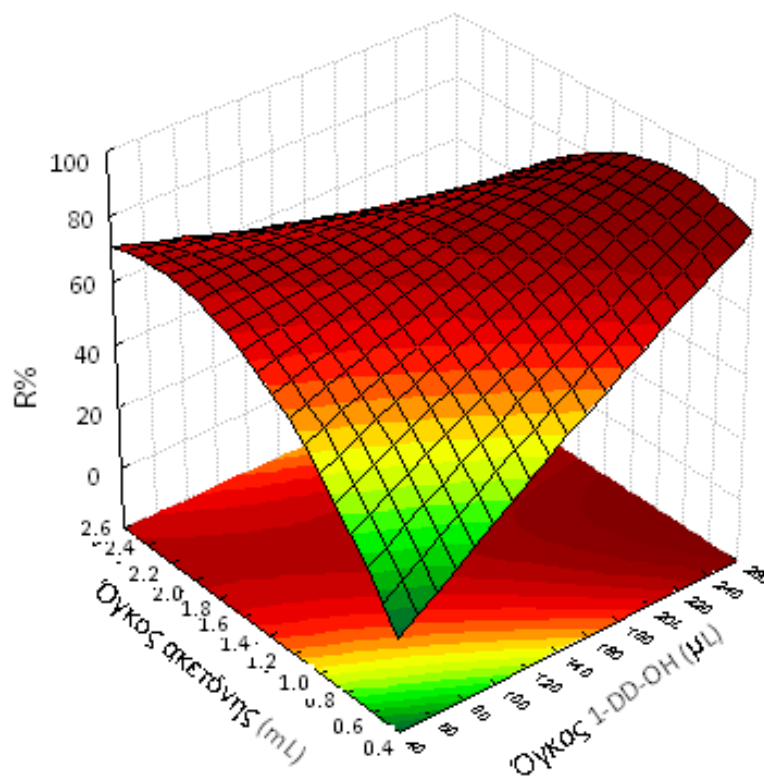
Πίνακας 9.5: Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) των παραγόντων X_1 , X_2 και X_4 χρησιμοποιώντας ως απόκριση την μέση τιμή της ανάκτηση της μεθόδου (R%).

	SS	df	MS	F-τιμή	ρ-τιμή Πιθανότητα > F	Παρατηρήσεις
Μοντέλο	1476.90	9	164.10	23.70	< 0.0001	Σημαντική
X_2	324.68	1	324.68	46.94	0.006	
X_1	9.76	1	9.76	1.41	0.320	
X_4	109.66	1	109.66	15.85	0.028	
X_2^2	8.26	1	8.26	1.19	0.354	
X_1^2	310.43	1	310.43	44.88	0.007	
X_4^2	263.86	1	263.86	38.15	0.008	
X_2X_1	399.78	1	399.78	57.80	0.005	
X_2X_4	35.56	1	35.56	5.14	0.108	
X_1X_4	14.96	1	14.96	2.16	0.237	
LOF	75.40	5	15.08	2.18	0.276	Ασήμαντη
Σφάλμα	20.75	3	6.92			
Συνολικό SS	1475.44	17				

Από τον Πίνακα 9.5 διαπιστώνεται ότι η τιμή του *LOF* δεν ήταν σημαντική ($p > 0.05$) ενώ η τιμή της σταθεράς προσδιορισμού R^2 (0.93484) ήταν αρκετά ικανοποιητική εκφράζοντας ότι το 93.5 % της διακύμανσης της απόκρισης μπορεί να ερμηνευτεί από το προτεινόμενο μοντέλο. Σε αυτή την περίπτωση, παρατηρούνται επιδράσεις πρώτου X_2 , X_4 και δευτέρου X_1^2 , X_4^2 βαθμού καθώς και η αλληλεπίδραση X_2X_1 που αναφέρεται στον όγκο της 1-DD-OH και της ακετόνης. Τέλος, μια δευτέρου βαθμού πολυωνυμική εξίσωση της ανάκτησης (R%) αναπτύχθηκε για να εκφράσει το προτεινόμενο μοντέλο (εξίσωση 35):

$$R^2 = 75.80 + 4.87X_2 + 2.83X_4 - 4.95X_1^2 - 4.56X_4^2 - 7.09X_2X_1 \quad (35)$$

όπου X_1 , X_2 και X_4 είναι οι κωδικοποιημένες τιμές των παραγόντων. Στο σχήμα 44 απεικονίζεται σε τρισδιάστατη μορφή (3D) η επίδραση των παραγόντων «όγκος ακετόνης-όγκος 1-DD-OH» στη μέση τιμή της ανάκτησης των επιλεγμένων αναλυτών, με την ιοντική ισχύ να βρίσκεται στο κεντρικό επίπεδο.



Σχήμα 44: Τρισδιάστατη απεικόνιση της επίδρασης των παραγόντων «όγκος της 1-DD-OH - όγκος ακετόνη» στη μέση τιμή της ανάκτησης των επιλεγμένων αναλυτών.

Παρατηρώντας το σχήμα 44 διαπιστώνουμε ότι όταν χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα μικροί όγκοι ακετόνης και 1-DD-OH, η ανάκτηση της μεθόδου είναι αρκετά χαμηλή (~10%). Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, η συμπεριφορά αυτή οφείλεται στο ότι ο μικρός όγκος του διαλύτη διασποράς δεν επαρκεί ώστε να διασπείρει

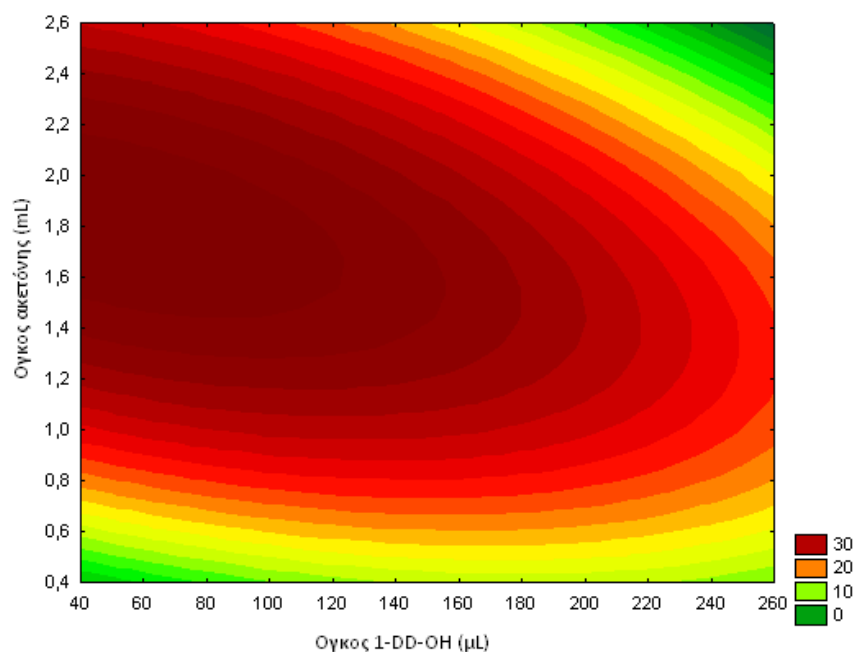
κατάλληλα τον διαλύτη εκχύλισης εντός του υδατικού διαλύματος (σχηματισμός θολώματος) [278]. Καθώς αυξάνει ο όγκος της ακετόνης (από 0.4 έως 2.6 mL) διατηρώντας τον όγκο της 1-DD-OH σε χαμηλές τιμές (40 έως 80 μ L) η ανάκτηση της μεθόδου αυξάνει σταδιακά φθάνοντας σε μια μέγιστη τιμή $\sim 70\%$. Όταν λαμβάνει χώρα η αντίστροφη διαδικασία, δηλαδή να αυξάνεται ο όγκος της 1-DD-OH (40 έως 260 μ L) διατηρώντας παράλληλα τον όγκο της ακετόνης σε ενδιάμεσες τιμές (0.8 – 1.2 mL) η ανάκτηση της μεθόδου παρουσιάζει σταδιακή αύξηση φθάνοντας $\sim 80\%$. Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, δυο περιοχές παρουσιάζουν υψηλές ανακτήσεις. Η συμπεριφορά αυτή του συστήματος είναι πιθανό να οφείλεται σε παραπλανητικά αποτελέσματα, όπως έχουμε ήδη αναφέρει. Κρίνεται λοιπόν σκόπιμο να χρησιμοποιήσουμε ως απόκριση την σχετική τυπική απόκλιση των ανακτήσεων. Με αυτό τον τρόπο οι βέλτιστες συνθήκες θα προσδιορισθούν στην περιοχή που αντιστοιχεί η χαμηλότερη δυνατή τιμή της σχετικής τυπικής απόκλισης των ανακτήσεων. Στον Πίνακα 9.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης της διακύμανσης (ANOVA) στην περίπτωση που ως απόκριση χρησιμοποιήθηκε η σχετική τυπική απόκλιση.

Πίνακας 9.6: Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) των παραγόντων X_1 , X_2 και X_4 χρησιμοποιώντας ως απόκριση την σχετική τυπική απόκλιση των ανακτήσεων (RSD%).

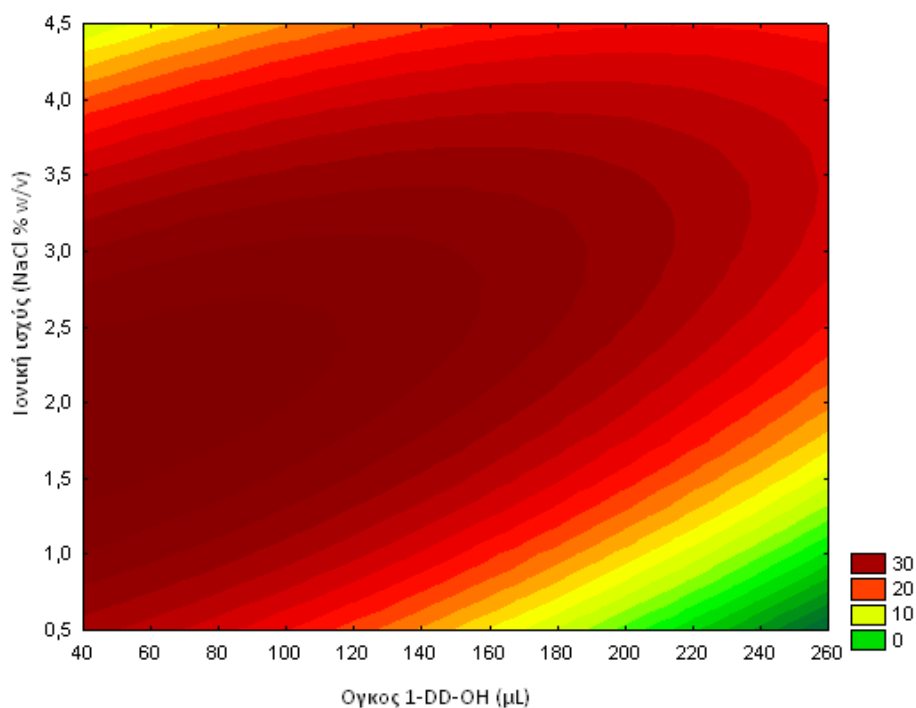
	SS	df	MS	F-τιμή	ρ-τιμή Πιθανότητα > F	Παρατηρήσεις
Μοντέλο	938.25	9	104.25	26.49	< 0.0001	Σημαντική
X_2	200.43	1	200.43	50.93	0.006	
X_1	22.58	1	22.58	5.74	0.060	
X_4	31.49	1	31.49	8.00	0.096	
X_2^2	34.30	1	34.30	8.72	0.004	
X_1^2	240.57	1	240.57	61.13	0.066	
X_4^2	242.03	1	242.03	61.50	0.004	
X_2X_1	51.71	1	51.71	13.14	0.036	
X_2X_4	109.41	1	109.41	27.80	0.013	
X_1X_4	5.74	1	5.74	1.46	0.314	
LOF	99.68	5	19.94	5.06	0.106	Ασήμαντη
Σφάλμα	11.81	3	3.94			
Συνολικό SS	932.13	17				

Από το Πίνακα 9.6 διαπιστώνουμε ότι η τιμή του LOF δεν ήταν σημαντική ($p > 0.05$), ενώ η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 (0.88039) εκφράζει ότι το 88% της διακύμανσης της απόκρισης μπορεί να ερμηνευτεί από το προτεινόμενο μοντέλο. Επιπρόσθετα, παρατηρείται ότι οι παράμετροι X_2 , X_2^2 , X_4^2 , X_2X_1 , X_2X_4 επηρεάζουν το σύστημα με τιμές $p < 0.05$. Οι δυο επιδράσεις που παρατηρούνται είναι ανάμεσα στους όγκους της 1-DD-OH και της ακετόνη και ανάμεσα στον όγκο της 1-DD-OH και την ιοντική ισχύ, αντίστοιχα. Στο σχήμα 45 (α και β) παρατηρείται η δισδιάστατη σχηματική απεικόνιση για τον προσδιορισμό των επιδράσεων των παραγόντων

«όγκος 1-DD-OH – όγκος ακετόνης» και «όγκος 1-DD-OH – ιοντική ισχύς». Σε αυτή την περίπτωση η βέλτιστη περιοχή των πειραματικών συνθηκών αντιστοιχεί στη χαμηλότερη δυνατή τιμή της σχετικής τυπικής απόκλισης των ανακτήσεων.



(α)



(β)

Σχήμα 45: Δισδιάστατη σχηματική απεικόνιση για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων (α) «όγκος 1-DD-OH – όγκος ακετόνης» και (β) «όγκος 1-DD-OH - ιοντική ισχύς» στην σχετική τυπική απόκλιση της μέσης τιμής της ανάκτησης των επιλεγμένων αναλυτών.

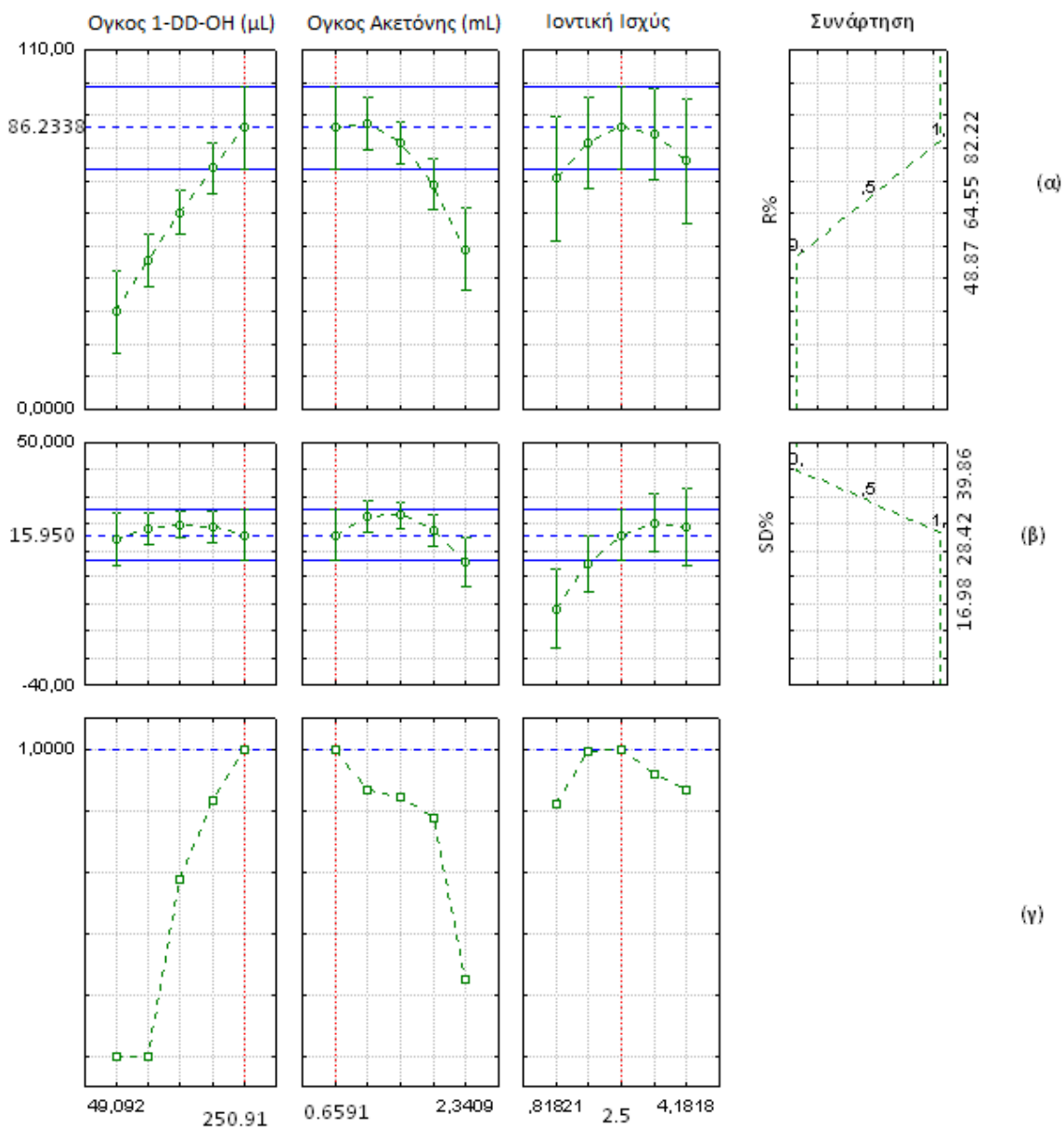
Στο σχήμα 45α, διαπιστώνεται ότι οι χαμηλότερες τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης βρίσκονται στην περιοχή όπου ο όγκος της 1-DD-OH και ο όγκος της ακετόνης βρίσκονται στις μέγιστες τιμές, δηλαδή στα 250 μ L και 2.5 mL, αντίστοιχα. Επιπλέον στο σχήμα 45β, η βέλτιστη περιοχή παρατηρείται όταν ο όγκος 1-DD-OH είναι στις μέγιστες τιμές (250 μ L) και η ιοντική ισχύς στις ελάχιστες τιμές (0.5 % w/v). Λαμβάνοντας υπόψη όλες τις παραπάνω παρατηρήσεις, οι τελικές βέλτιστες συνθήκες (σύμφωνα με τα δεδομένα από το CCD) έχουν ως εξής: 250 μ L 1-DD-OH, 1.85 mL ακετόνη και 1.50 % w/v NaCl.

9.3.3.3. Βελτιστοποίηση Με Τη Μέθοδο Της Επιθυμητής Συνάρτησης (Desirability Function)

Όπως αναφέραμε και παραπάνω, η βέλτιστη περιοχή των πειραματικών συνθηκών αντιστοιχεί στην υψηλότερη δυνατή μέση τιμή της ανάκτησης (R%) και στην ταυτόχρονη χαμηλότερη δυνατή τιμή της σχετικής τυπικής απόκλισης των ανακτήσεων (RSD%). Γι αυτό τον λόγο, ως βέλτιστη περιοχή των πειραματικών συνθηκών για την **DLLME-SFO** μέθοδο βρέθηκε να είναι αυτή που αντιστοιχεί σε **κοινή** ή **κοινές** τιμές μεταξύ των παραπάνω βέλτιστων περιοχών. Για να προσδιορισθεί ακριβώς η βέλτιστη περιοχή τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της επιθυμητής συνάρτησης. Στο σχήμα 46 απεικονίζονται μεμονωμένα οι προβλεπόμενες τιμές για το μίγμα των επιλεγμένων αναλυτών, στην περίπτωση που ως απόκριση επιλέχθηκε αρχικά η μέση τιμή της ανάκτησης (46α), εν συνεχεία η σχετική τυπική απόκλιση των ανακτήσεων (46β) και τέλος ο συνδυασμός των δυο (46γ).

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα από τον CCD σχεδιασμό (Πίνακας 9.4) καθώς και το σχήμα 46α (ως απόκριση ελήφθη η μέση τιμή της ανάκτησης (R%)) παρατηρήθηκε ότι η κωδικοποιημένη τιμή 1.0 εκφράζει τη μέγιστη ανάκτηση (82.2%), η κωδικοποιημένη τιμή 0.0 την ελάχιστη (54.6%) και κωδικοποιημένη τιμή 0.5 την ενδιάμεση (64.6%). Στην περίπτωση που ως απόκριση ελήφθη η σχετική

τυπική απόκλιση των ανακτήσεων (RSD%) (σχήμα 46β), η κωδικοποιημένη τιμή 1.0 εκφράζει την ελάχιστη σχετική τυπική απόκλιση (16.9%), η 0.0 την μέγιστη (39.9%) και 0.5 την ενδιάμεση (28.4%). Στο αριστερό κάτω τμήμα του σχήματος (47γ) παρατηρούνται οι βέλτιστες προβλεπόμενες τιμές ώστε να επιτευχθούν οι υψηλότερες δυνατές μέσες τιμές των ανακτήσεων με τις χαμηλότερες δυνατές σχετικές τυπικές αποκλίσεις για το μίγμα των επιλεγμένων αναλυτών. Με βάση τους υπολογισμούς που πραγματοποιήθηκαν από το πρόγραμμα οι βέλτιστες τιμές για κάθε παράμετρο είναι 251 μL 1-DD-OH, 0.65 mL ακετόνης και 2.50 % w/v η ιοντική ισχύς.

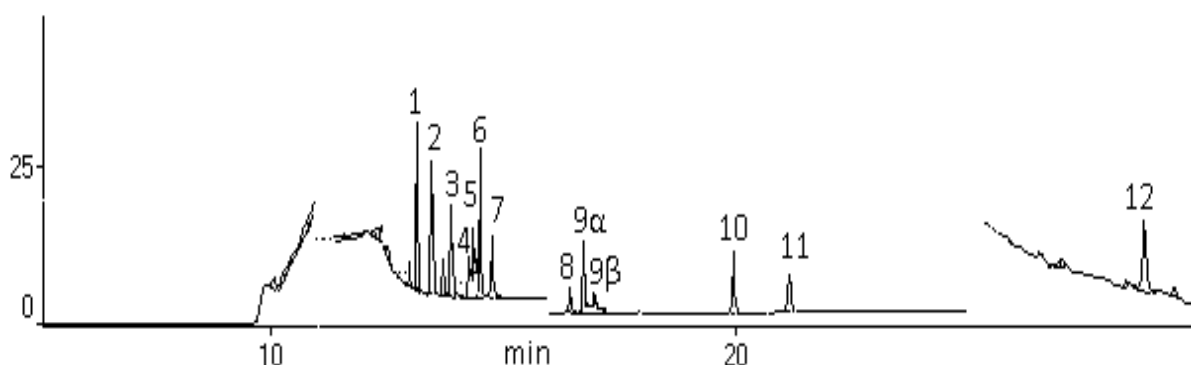


Σχήμα 46: Οι προβλεπόμενες τιμές για το μίγμα των επιλεγμένων αναλυτών όταν ως απόκριση λαμβάνεται (α) η μέση τιμή της ανάκτησης, (β) η σχετική τυπική απόκλιση των ανακτήσεων και (γ) ο συνδυασμός των δυο.

9.3.4. Επικύρωση Της **DLLME-SFO** Μεθόδου

9.3.4.1. Γραμμικότητα, Πιστότητα Και Ευαισθησία Της Μεθόδου

Η επικύρωση της **DLLME-SFO** μεθόδου ελέγχθηκε σε νερό πηγής εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν, σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g L}^{-1}$ μίγματος. Στο σχήμα 47 φαίνεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος $25 \mu\text{g L}^{-1}$.



Σχήμα 47: Χρωματογράφημα GC-MS ύστερα από εκχύλιση με την μέθοδο **DLLME-SFO** των επιλεγμένων φίλτρων UV, PCMs και PAEs σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g L}^{-1}$: (1) ADBI, (2) AHMI, (3) Octylsalicylate, (4) ATII, (5) HHCB, (6) AHTN, (7) HMS, (8) E4360, (9) E6300, (10) OD-PABA, (11) BBP, (12) DOP.

Η γραμμικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με τον υπολογισμό των σταθερών προσδιορισμού r^2 . Το εύρος γραμμικότητας των αναλυτών κυμάνθηκε μεταξύ του 0.22 έως $500.00 \mu\text{g L}^{-1}$ για όλους τους αναλύτες, με τις σταθερές προσδιορισμού να κυμαίνονται από 0.9911 έως 0.9999 . Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) για την πιστότητα ($n=5 \times 3$ μέρες) και την ημερήσια πιστότητα ($n=15$ δείγματα) της μεθόδου δεν ξεπέρασαν το 12.1 και 13.1 %, αντίστοιχα. Η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε μέσω των ορίων ανίχνευσης (LOD_s), τα οποία κυμάνθηκαν από 62.5 έως 525.0 ng L^{-1} για όλους τους αναλύτες. Στον Πίνακα 9.8 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα.

Πίνακας 9.8: Γραμμικότητα, επαναληψιμότητα, αναπαραγωγικότητα, όρια ανίχνευσης (LOD_s) και ανακτήσεις (R%) σε νερό πηγής με τη μέθοδο *DLLME-SFO*.

Αναλύτες	Γραμμικότητα ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Επαναληψι- μότητα (RSD %)	Αναπαραγωγι- κότητα (RSD %)	LOD (ng L^{-1})	Ανάκτηση (R%)
ADBI	1.10 – 500.00	0.9998	4.1	5.1	315.0	81.7
AHMI	1.20 – 500.00	0.9911	5.0	6.9	350.0	71.2
Octylsalicylate	1.00 – 500.00	0.9990	6.6	3.8	260.0	90.2
ATII	2.10- 500.00	0.9999	10.9	7.4	525.0	87.8
HHCB	1.50- 500.00	0.9997	12.0	5.6	450.0	94.5
AHTN	1.20 – 500.00	0.9992	8.3	9.1	355.0	96.7
HMS	0.40 – 500.00	0.9983	2.3	5.8	112.0	97.5
E4360	0.22 – 500.00	0.9946	9.1	11.0	62.5	78.9
E6300	0.45 – 500.00	0.9979	5.5	12.1	125.0	76.8
OD-PABA	0.45 – 500.00	0.9991	13.1	8.8	125.0	78.0
BBP	0.60 – 500.00	0.9983	2.8	4.3	156.0	73.7
DOP	0.70 – 500.00	0.9989	11.7	9.7	200.0	90.7

Ποικίλα συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν συγκρίνοντας τα δεδομένα του Πίνακα 9.8 με αυτά των Πινάκων 8.6 και 8.14. Στην περίπτωση των φίλτρων UV (Πίνακας 8.6), η γραμμικότητα, τα LOD_s και οι ανακτήσεις (R%) βρέθηκαν να κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα με αυτά του Πίνακα 9.8. Τα αποτελέσματα σε αυτή την περίπτωση ήταν αναμενόμενα καθώς οι συνθήκες εκχύλισης της *DLLME-SFO* μεθόδου στην περίπτωση του μίγματος ήταν οι ίδιες με αυτές των φίλτρων UV (Κεφάλαιο 8).

Αντίθετα, στην περίπτωση των PCMs (Πίνακας 8.14), τα LOD_s και οι ανακτήσεις (R%) βρέθηκαν να διαφέρουν συγκρινόμενες με αυτές του Πίνακα 9.8. Πιθανή αιτία αυτής της συμπεριφοράς είναι οι διαφορετικοί παράγοντες (διαλύτης εκχύλισης, διαλύτης διασποράς και ιοντική ισχύς) που χρησιμοποιήθηκαν αλλά και οι διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης. Όπως αναφέραμε και παραπάνω, στην περίπτωση του συνολικού μίγματος αναλυτών ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε η 1-DD-OH αντί της 1-UD-OH που χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση του μίγματος PCMs και PAEs (Κεφάλαιο 8). Η αλλαγή αυτή του διαλύτη εκχύλισης επιφέρει μια μικρή μείωση στις τιμές των ανακτήσεων ενώ η χρήση NaCl μειώνει περαιτέρω τις ανακτήσεις προκαλώντας μια μικρή αύξηση των LOD_s. Εν κατακλείδι, στην περίπτωση των PAEs δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα αποτελέσματα.

9.4. Εφαρμογή Της **DLLME-SFO** Μεθόδου Σε Στερεό Υπόστρωμα

9.4.1. Υγρή Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς Βασιζόμενη Στην Στερεοποίηση Της Επιπλέουσας Οργανικής Φάσης (**DLLME-SFO**)

Η διαδικασία εμβολιασμού και εκχύλισης του συνολικού μίγματος αναλυτών σε δείγματα εδάφους (από την περιοχή της Κοζάνης) με τη **DLLME-SFO** μέθοδο είχε ως εξής:

Αρχικά κατάλληλη ποσότητα μίγματος προστέθηκε σε 5 mL ακετόνης (τελική συγκέντρωση $25 \mu\text{g Kg}^{-1}$) και εμβολιάστηκε σε 0.705 gr δείγματος εδάφους. Τα εμβολιασμένα δείγματα ομογενοποιήθηκαν με ανάδευση και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h μέχρι πλήρους εξατμίσεως του διαλύτη. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές διπλές εκπλύσεις των δειγμάτων με 6.12 mL ακετόνης και τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων (ισχύς 110W) στους 25°C για 20 min. Οι εκπλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τον διαλύτη διασποράς που έχει επιλεγεί από την Ενότητα 9.3.2. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φυγόκεντρο στις 5000 rpm για 10 min. Τα υπερκείμενα διαλύματα συνενώθηκαν σε φυγοκεντρικό σωλήνα και συμπυκνώθηκαν στα 0.659 mL ακετόνης με τη βοήθεια αέριου азώτου. Μετά το τέλος της διεργασίας, τα δείγματα ακετόνης ήταν έτοιμα για την εκχύλιση με τη DLLME-SFO μέθοδο (Κεφάλαιο 9, Ενότητα 9.3.1).

9.4.2. Πολυπαραγοντική Μέθοδος

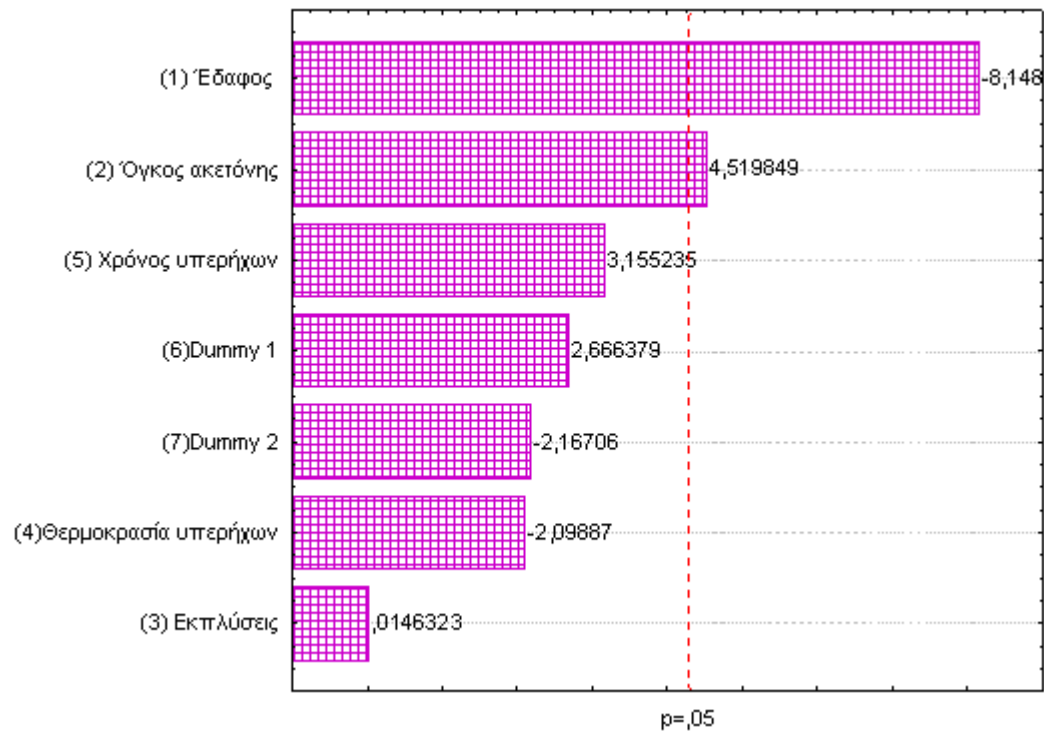
9.4.2.1. Σχεδιασμός Αξιολόγησης Plackett-Burman

Ένας 2^{7-4} πειραματικός σχεδιασμός εφαρμόστηκε ώστε να προσδιοριστούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόκριση της μεθόδου. Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν ήταν: η ποσότητα του εδάφους (gr), ο όγκος του διαλύτη διασποράς (ακετόνη, mL), ο αριθμός των εκπλύσεων, η θερμοκρασία ($^{\circ}\text{C}$) και ο χρόνος παραμονής του διαλύματος (min) στο λουτρό υπερήχων. Ο πειραματικός σχεδιασμός ολοκληρώθηκε χρησιμοποιώντας δυο ψευτομεταβλητές (*dummy*). Ως απόκριση επιλέχθηκε η μέση τιμή των ανακτήσεων των αναλυτών για κάθε σειρά

πειραμάτων (R%). Οι παράγοντες, οι κωδικοποιημένες τιμές και τα επίπεδα τιμών αυτών παρατίθενται στον Πίνακα 9.9.

Πίνακας 9.9: Οι πειραματικοί παράγοντες, οι κωδικοποιημένες τιμές, τα επίπεδα τιμών τους για τον πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman

Παράγοντες	Κωδικοποιημένες τιμές	Επίπεδα		
		Χαμηλό (-1)	Κεντρικό (0)	Υψηλό(+1)
Έδαφος (gr)	S ₁	0.50	1.25	2.00
Όγκος ακετόνης (mL)	S ₂	1	3	5
Εκπλύσεις	S ₃	1	2	3
Θερμοκρασία Υπερήχων (°C)	S ₄	0	25	50
Χρόνος παραμονής υπερήχους (min)	S ₅	10	20	30
Dummy 1	S ₆	-1	0	1
Dummy 2	S ₇	-1	0	1



Σχήμα 48: Απεικόνιση του διαγράμματος Pareto για τον 2^{7-4} πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman.

Πίνακας 9.10. Αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για τον 2^{7-4} πειραματικό σχεδιασμό αξιολόγησης Plackett–Burman.

	Επίδραση	Σταθερές	t	P
Αλληλεπίδραση	46.92	46.92	50.16	0.0004
S_1	-15.24	-7.62	-8.15	0.015
S_2	8.46	4.23	4.52	0.046
S_3	0.027	0.014	0.015	0.989
S_4	-3.93	-1.96	-2.10	0.171
S_5	5.90	2.95	3.16	0.087

Σύμφωνα με το διάγραμμα Pareto (σχήμα 48) και τα αποτελέσματα από την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 9.10) συνάγουμε το συμπέρασμα ότι οι

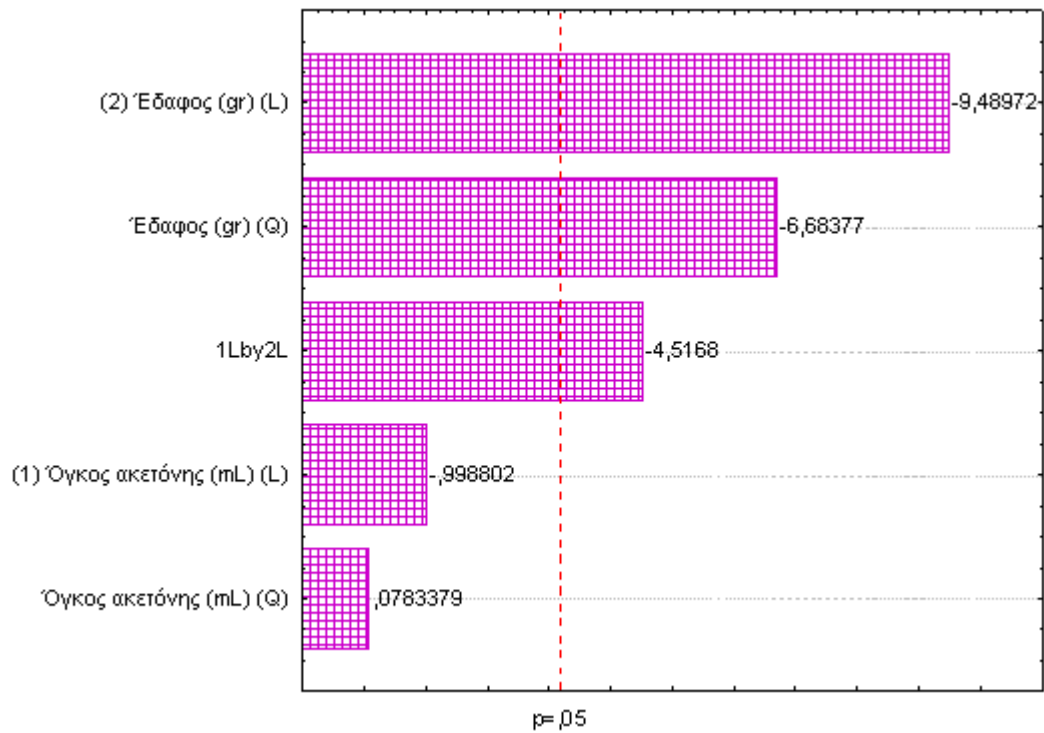
παράγοντες έδαφος (S_1) και όγκος ακετόνης (S_2) επηρεάζουν την ανάκτηση της μεθόδου με αρνητικό και θετικό τρόπο ($p < 0.05$), αντίστοιχα. Η αρνητική επίδραση του εδάφους, καθώς αυξάνεται η χρησιμοποιούμενη ποσότητα (0.5 έως 2.0 gr), πιθανόν να οφείλεται στο μέγεθος και τη σύσταση των κόκκων του (Πίνακας 5.2). Σύμφωνα με τον E. V. Lau και την ομάδα του [319] το μικρό μέγεθος των κόκκων του εδάφους επιτρέπει την ευρεία διάχυση του διαλύτη εντός του υποστρώματος. Με αυτό τον τρόπο, αυξάνεται ο ρυθμός ροής του και κατά συνέπεια η απόδοση της εκχύλισης. Επιπλέον, είναι πιθανόν να οφείλεται στην ανάμιξη ξένων ουσιών με τον διαλύτη έκλουσης, παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την πλήρη εκχύλιση των αναλυτών [320]. Καταλήγοντας, στο επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας επιλέχθηκαν οι παράγοντες έδαφος (S_1) και όγκος ακετόνης (S_2) για περαιτέρω διερεύνηση.

9.4.2.2. Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)

Επόμενο βήμα της πειραματικής διαδικασίας είναι η βελτιστοποίηση των επιλεγμένων παραγόντων, έδαφος (S_1) και όγκος ακετόνης (S_2). Σύμφωνα με το διάγραμμα Pareto (σχήμα 48), η θερμοκρασία στο λουτρό υπερήχων (S_4) παρέμεινε αμετάβλητη στους 35°C ώστε να αποφευχθεί η θερμική διάσπαση των αναλυτών ενώ πραγματοποιήθηκαν από τρεις εκπλύσεις (S_3) σε κάθε δείγμα για 30 min (S_5). Ο πειραματικός σχεδιασμός που εφαρμόστηκε ήταν ένας 2^2 σχεδιασμός όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 9.11.

Πίνακας 9.11: Σύνολο δεδομένων του Κεντρικού Σύνθετου Σχεδιασμού.

Παράγοντες	Επίπεδα			Κεντρικά σημεία	
				($\alpha = 1.418$)	
	Χαμηλό (-1)	Κεντρικό (0)	Υψηλό (+1)	- α	+ α
(S ₂) Όγκος ακετόνης (mL)	2.50	4.00	5.50	1.88	6.12
(S ₁) Έδαφος (gr)	0.50	1.20	1.90	0.21	2.19
Σειρά	S ₂	S ₁	R%		
1	-1	-1	63.4		
2	-1	+1	54.9		
3	+1	-1	76.9		
4	+1	+1	38.5		
5	- α	0	76.9		
6	+ α	0	72.4		
7	0	- α	71.8		
8	0	+ α	41.9		
9	0	0	69.2		
10	0	0	70.8		
11	0	0	67.7		
12	0	0	75.4		



Σχήμα 49: Απεικόνιση του διαγράμματος Pareto για το CCD.

Πίνακας 9.12: Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για τον προτεινόμενο πειραματικό σχεδιασμό.

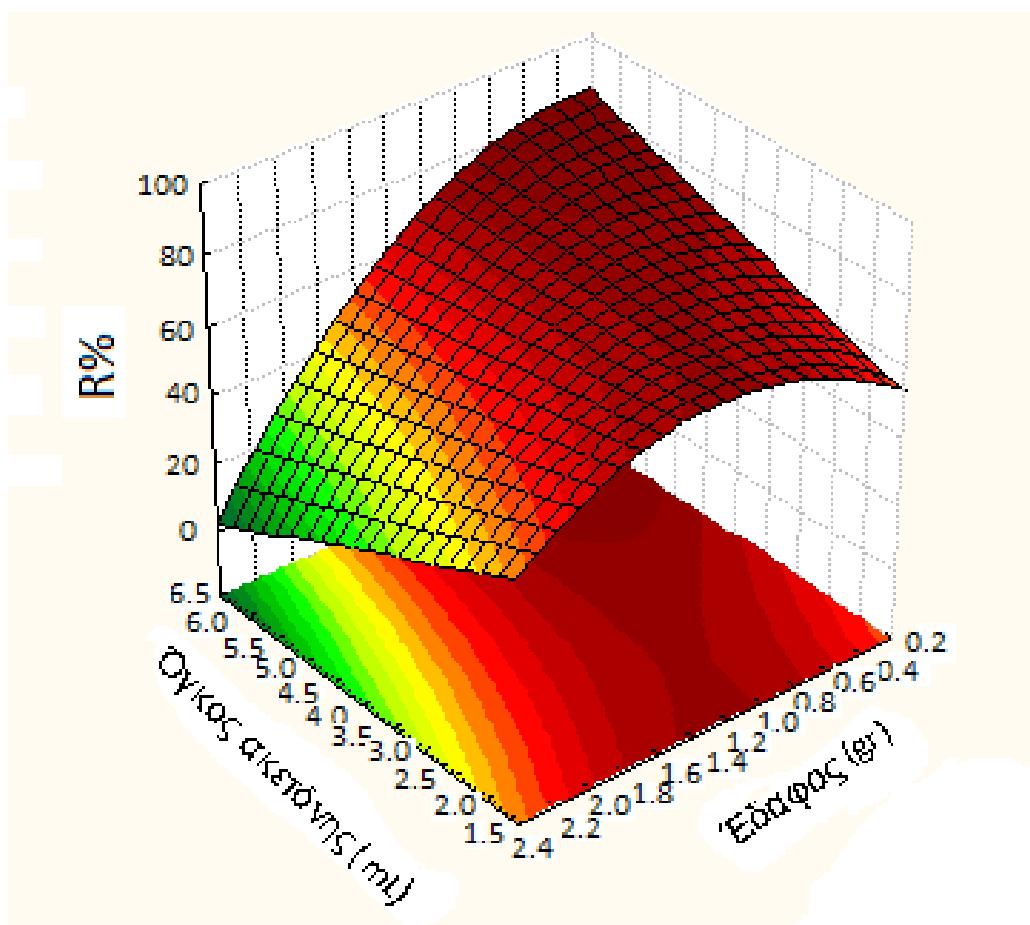
	SS	df	MS	F-τιμή	ρ-τιμή	
					Πιθανότητα > F	
Μοντέλο	1724.50	5	344.90	31.22	< 0.0001	Σημαντική
S_2	11.00	1	11.00	0.997	0.391	
S_1	994.70	1	994.70	90.05	0.003	
S_2^2	0.068	1	0.068	0.006	0.942	
S_1^2	493.40	1	493.40	44.67	0.007	
S_2S_1	225.30	1	225.30	20.40	0.020	
LOF	111.70	3	37.20	3.37	0.172	Ασήμαντη
Σφάλμα	33.10	3	11.00			
Συνολικό SS	1892.30	11				

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 9.12) και το διάγραμμα Pareto (σχήμα 49) χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία και ερμηνεία των δεδομένων. Η τιμή του LOF δεν βρέθηκε να είναι σημαντική με $p > 0.05$, ενώ η τιμή της σταθεράς προσδιορισμού R^2 (0.92346) ήταν αρκετά ικανοποιητική εκφράζοντας ότι το 92.34 % της διακύμανσης της απόκρισης μπορεί να ερμηνευτεί από το προτεινόμενο μοντέλο. Από τα πειραματικά δεδομένα παρατηρούνται επιδράσεις πρώτου S_1 και δευτέρου βαθμού S_1^2 καθώς και η αλληλεπίδραση S_2S_1 . Στο τελικό στάδιο του πειραματικού σχεδιασμού και με βάση τα πειραματικά δεδομένα εξάγεται η δευτέρου βαθμού πολυωνυμική εξίσωση της ανάκτησης (R%) (εξίσωση 36):

$$R\% = 70.7 - 11.2S_1 - 8.8S_1^2 - 7.5S_2S_1 \quad (36)$$

όπου S_1 και S_2 είναι οι κωδικοποιημένες τιμές των επιλεγμένων παραγόντων.

Αναλύοντας την εξίσωση 36 και λαμβάνοντας υπόψη μόνο τις επιδράσεις πρώτου βαθμού, παρατηρείται ότι ο παράγοντας S_1 επηρεάζει αρνητικά την ανάκτηση (R%) της μεθόδου. Η 3D απεικόνιση της πολυωνυμικής εξίσωσης 36 για την επίδραση «έδαφος-όγκος ακετόνης» απεικονίζεται στο σχήμα 50.



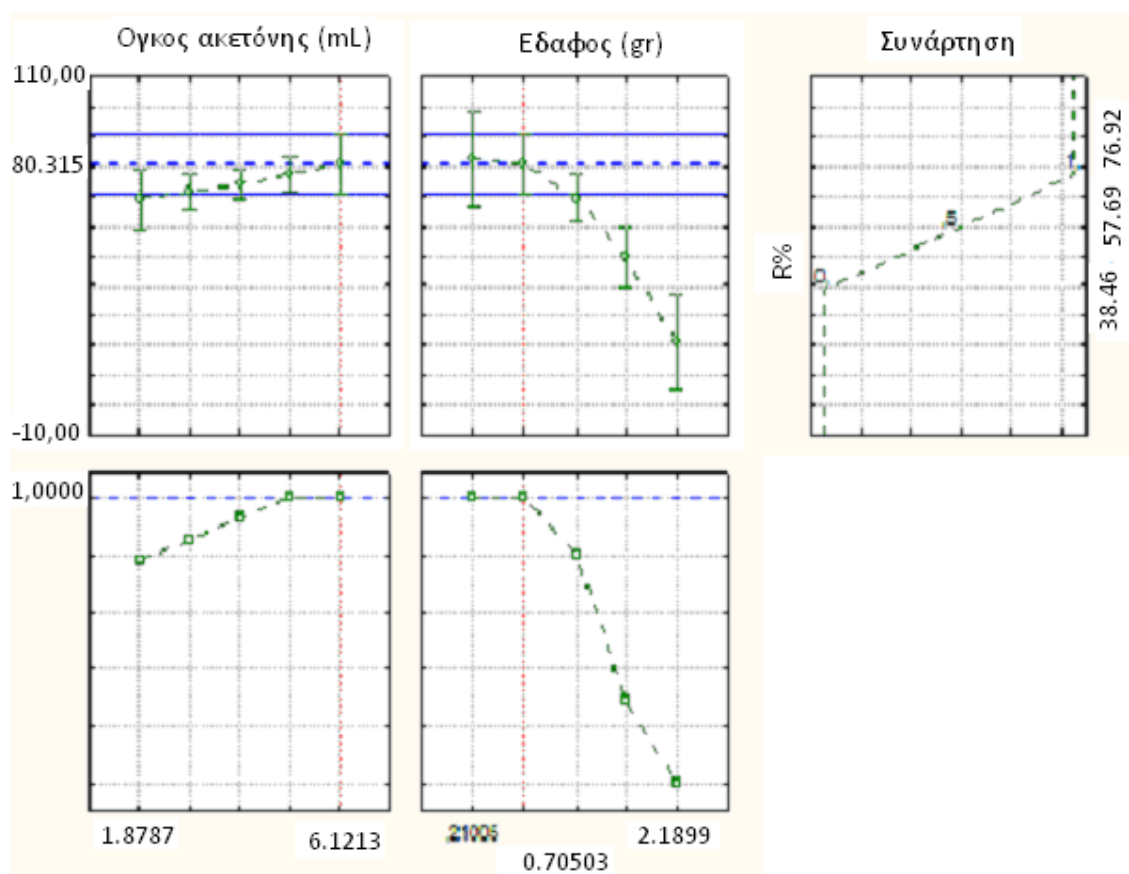
Σχήμα 50: Τρισδιάστατη απεικόνιση της αλληλεπίδρασης «έδαφος - όγκος ακετόνης».

Σύμφωνα με το σχήμα 50, διαπιστώνεται ότι όταν χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα υψηλές τιμές και για τους δυο υπό μελέτη παράγοντες (έδαφος και όγκος ακετόνης), η τιμή της ανάκτησης είναι πολύ χαμηλή ($R \approx 5\%$). Είναι πιθανόν, η χαμηλή τιμή που παρατηρείται να οφείλεται σε ξένες ουσίες οι οποίες αναμιγνύονται με τον διαλύτη έκλουσης παρεμποδίζοντας την πλήρη εκχύλιση των αναλυτών [315]. Καθώς μειώνεται ο όγκος της ακετόνης (έως 1.5 mL) διατηρώντας παράλληλα σταθερή την ποσότητα του εδάφους (2.4 gr) η ανάκτηση παρουσιάζει σταδιακή αύξηση φθάνοντας το 40%. Κρατώντας στη συνέχεια σταθερό τον όγκο της ακετόνης (1.5 mL) μειώνοντας σταδιακά την ποσότητα του εδάφους (έως 1.0 gr) παρατηρείται αύξηση της τιμής της ανάκτησης φθάνοντας $\approx 60\%$ και στη συνέχεια μειώνεται (για ποσότητα εδάφους < 1.0 gr). Σύμφωνα με το σχήμα, η μέγιστη τιμή της ανάκτησης ($R \approx 88\%$) βρέθηκε όταν ο όγκος της ακετόνης ήταν μέγιστος (~ 6.0

mL) ενώ η ποσότητα του χρησιμοποιούμενου εδάφους ήταν ~ 1.0 gr. Είναι πιθανό στην ποσότητα αυτή εδάφους, η ακετόνη να εκχυλίζει ικανοποιητικά τους αναλύτες περιορίζοντας την συνεκχύλιση ουσιών που ενδεχομένως να παρεμπόδιζαν την εκχύλιση.

9.4.2.3. Βελτιστοποίηση Με Τη Μέθοδο Της Επιθυμητής Συνάρτησης (Desirability Function)

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα από το CCD σχέδιο (Πίνακας 9.11), η μέγιστη και ελάχιστη τιμή της ανάκτηση (R%) που παρατηρήθηκε ήταν 76.9 και 38.5%, αντίστοιχα. Στα δεξιά του σχήματος 51 απεικονίζονται τα δεδομένα της επιθυμητής συνάρτησης για κάθε παράγοντα: η κωδικοποιημένη τιμή 1.0 εκφράζει τη μέγιστη ανάκτηση (76.92 %), η 0.0 την ελάχιστη (38.46 %) και 0.5 την ενδιάμεση (57.69 %). Στο αριστερό κάτω τμήμα του σχήματος 51 βρίσκονται οι βέλτιστες τιμές για κάθε μια παράμετρο ξεχωριστά σύμφωνα με τον μέσο όρο της ανάκτησης (R%).



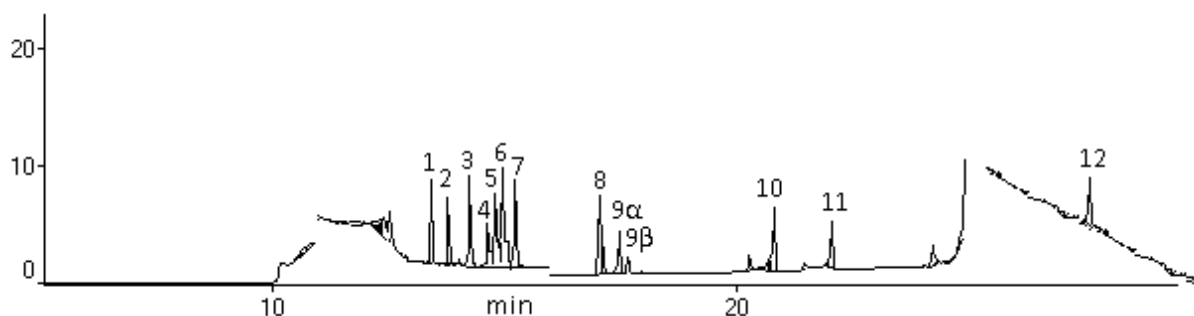
Σχήμα 51: Οι προβλεπόμενες τιμές για το μίγμα των αναλυτών.

Με βάση τους υπολογισμούς που πραγματοποιήθηκαν από το πρόγραμμα, η μέγιστη ανάκτηση (R%) της μεθόδου υπολογίστηκε στα 80.3 %, με τις βέλτιστες τιμές για κάθε παράμετρο να είναι 6.12 mL ακετόνης και 0.705 gr εδάφους. Για να επαληθευτούν οι παραπάνω τιμές πραγματοποιήθηκαν επαναληπτικά πειράματα με τις βέλτιστες συνθήκες.

9.4.3. Επικύρωση Της **DLLME-SFO** Μεθόδου Σε Στερεό Υπόστρωμα

9.4.3.1. Γραμμικότητα, Πιστότητα Και Ευαισθησία Της Μεθόδου

Η μέθοδος επικυρώθηκε σε δείγματα εδάφους από την περιοχή της Κοζάνης εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν από την Ενότητα 9.3.1. Στο σχήμα 52 φαίνεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος με το μίγμα των αναλυτών σε συγκέντρωση $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$.



Σχήμα 52: Χρωματογράφημα GC-MS ύστερα από εκχύλιση με τη μέθοδο **DLLME-SFO** των επιλεγμένων φίλτρων UV, PCMs και PAEs σε συγκέντρωση $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$ σε στερεό υπόστρωμα: (1) ADBI, (2) AHMI, (3) Octylsalicylate, (4) ATII, (5) HHCB, (6) AHTN, (7) HMS, (8) E4360, (9) E6300, (10) OD-PABA, (11) BBP, (12) DOP.

Η γραμμικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με τον υπολογισμό των σταθερών προσδιορισμού r^2 . Το εύρος γραμμικότητας των αναλυτών κυμάνθηκε μεταξύ 0.4 και $500.0 \mu\text{g Kg}^{-1}$, με σταθερές προσδιορισμού μεγαλύτερες ή ίσες με 0.9992. Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) για την πιστότητα ($n=5 \times 3$ μέρες) και την ημερήσια πιστότητα ($n=15$ δείγματα) της μεθόδου δεν ξεπέρασαν το 13.6 και 14.0 % αντίστοιχα ενώ τα όρια ανίχνευσης (LOD_s) της μεθόδου κυμάνθηκαν από 310 έως 2750 ng Kg^{-1} για όλους τους αναλύτες. Στον Πίνακα 9.13 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα που εξήχθησαν.

Πίνακας 9.13: Γραμμικότητα, επαναληψιμότητα, αναπαραγωγικότητα, όρια ανίχνευσης (LOD_s) και ανακτήσεις (R%) σε στερεό υπόστρωμα με τη μέθοδο *DLLME-SFO*.

Αναλύτες	Γραμμικότητα ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	r^2	Επαναληψι- μότητα (RSD %)	Αναπαραγωγι- κότητα (RSD %)	LOD (ng Kg^{-1})	Ανάκτηση (R%)
ADBI	1.5-500.0	0.9995	12.9	9.8	400	68.6
AHMI	1.5-500.0	0.9998	13.8	11.2	450	69.6
Octylsalicylate	4.5-500.0	0.9998	9.2	12.3	1260	88.2
ATII	5.2-500.0	0.9999	14.0	13.6	1560	67.2
HHCB	4.7-500.0	0.9997	12.4	10.1	1370	96.9
AHTN	0.4-500.0	0.9991	9.7	11.0	100	91.1
HMS	1.2-500.0	0.9998	11.0	12.1	340	88.6
E4360	9.2-500.0	0.9992	10.0	8.8	2750	68.6
E6300	2.5-500.0	0.9998	7.7	10.5	740	77.0
OD-PABA	2.5-500.0	0.9998	10.5	9.9	750	66.1
BBP	1.0-500.0	0.9998	7.3	9.3	310	74.9
DOP	0.6-500.0	0.9999	13.6	12.0	170	81.1

9.4.3.2. Δείγματα Εδάφους

Μετά τη βελτιστοποίηση και την επικύρωση της *DLLME-SFO* μεθόδου, θα πρέπει να επιβεβαιωθεί η εφαρμογή της σε ένα εύρος πραγματικών δειγμάτων. Γι' αυτό το λόγω η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δυο διαφορετικούς τύπους εδάφους (Ηπείρου και Ορεστιάδας). Τα δείγματα αρχικά ελεγχθήκαν για τυχόν υπολείμματα αναλυτών και βρέθηκαν να είναι καθαρά. Για κάθε υπόστρωμα, η ανάλυση έγινε σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων 25, 50 και 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ από τρεις φορές (Πίνακας 9.14). Από τον Πίνακα 9.14 διαπιστώνεται ότι οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 54.8 έως

88.4% για το χώμα της Ηπείρου και από 62.6 έως 98.5% για το χώμα της Ορεστιάδας. Τα αποτελέσματα του Πίνακα 9.14 συγκρινόμενα με αυτά του Πίνακα 9.13 έχουν λογική καθώς οι διαφορές που παρατηρούνται στις τιμές των ανακτήσεων, $R_{\text{Κοζάνη}}\% > R_{\text{Ορεστιάδα}}\% > R_{\text{Ηπείρου}}\%$ οφείλονται στα διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών (Πίνακας 5.2).

Πίνακας 9.14: Ανακτήσεις και RSD % των φίλτρων UV, των PCMs και PAEs σε δείγματα εδάφους από τις περιοχές της Ηπείρου και της Ορεστιάδας.

Αναλύτες	Αρχική C ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Ήπειρος			Ορεστιάδα		
		Τελική C	R%	RSD%	Τελική C	R%	RSD%
		($\mu\text{g Kg}^{-1}$)			($\mu\text{g Kg}^{-1}$)		
ADBI	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	15.2	60.8	10.5	17.5	70.0	6.5
	50	31.4	62.8	9.9	33.1	66.2	7.8
	100	66.0	66.0	11.0	67.5	67.5	10.1
AHMI	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	14.2	56.8	11.3	17.2	68.8	10.3
	50	33.6	67.2	9.8	35.1	70.2	7.8
	100	68.5	68.5	11.1	67.1	67.1	9.9
Octylsalicylate	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	17.9	71.5	9.1	23.9	95.6	9.4
	50	30.3	60.6	8.8	41.9	83.8	9.2
	100	74.6	74.6	8.5	71.5	71.5	7.7
ATII	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	16.6	66.4	12.2	17.1	68.4	13.1
	50	32.2	64.6	11.9	33.9	67.0	12.5
	100	67.0	67.0	12.6	70.2	70.2	10.3
HHCB	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	19.1	76.4	8.7	23.2	92.8	13.0
	50	40.1	80.2	8.5	48.1	96.2	11.3
	100	77.2	77.2	11.6	85.4	85.4	11.7

Αναλύτες	Αρχική C ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Ήπειρος			Ορεστιάδα		
		Τελική C ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	R%	RSD%	Τελική C ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	R%	RSD%
AHTN	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	22.1	88.4	10.0	22.6	90.7	12.5
	50	44.0	88.0	10.6	49.2	98.5	12.3
	100	87.4	87.4	9.8	90.3	90.3	11.7
HMS	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	18.1	72.4	7.6	23.3	93.2	11.0
	50	33.0	66.1	9.6	42.9	85.7	11.8
	100	78.1	78.1	9.3	85.9	85.9	13.6
E4360	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	15.5	62.0	6.6	18.0	72	8.0
	50	30.5	61.0	7.4	31.3	62.6	7.7
	100	58.3	58.3	7.7	69.8	69.8	10.4
E6300	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	14.6	58.4	7.5	18.8	75.2	8.8
	50	28.8	57.6	8.3	36.6	73.2	12.2
	100	63.9	63.9	10.9	69.7	69.7	7.9
OD-PABA	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	13.7	54.8	11.5	17.4	69.8	12.3
	50	29.2	58.4	10.7	33.3	66.6	11.5
	100	64.7	64.7	9.8	68.3	68.3	11.9

Αναλύτες	Αρχική C		Ήπειρος		Ορεστιάδα		
	(μg Kg ⁻¹)	Τελική C	R%	RSD%	Τελική C	R%	RSD%
		(μg Kg ⁻¹)			(μg Kg ⁻¹)		
BBP	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	17.7	70.8	6.5	19.4	77.6	8.1
	50	35.7	71.4	7.4	38.8	77.6	8.5
	100	73.8	73.8	6.6	76.6	76.6	5.5
DOP	0	nd*	-	-	nd*	-	-
	25	19.3	77.3	11.0	20.4	81.7	9.6
	50	30.9	61.8	11.5	36.7	73.4	12.3
	100	66.9	66.9	7.8	79.9	79.9	10.0

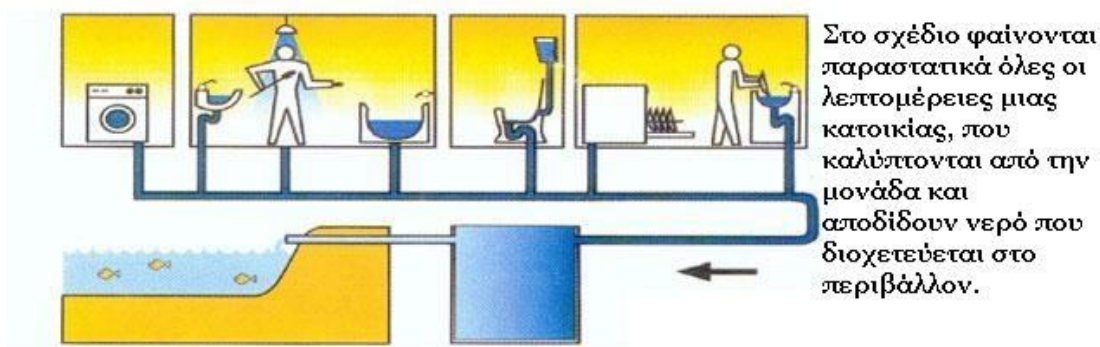
*nd (not detected) = δεν ανιχνεύεται

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

**ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ DLLME-SFO ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΥΓΡΑ
ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΚΑΙ ΙΛΥΣ ΤΩΝ ΜΟΝΑΔΩΝ
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΤΗΣ ΠΟΛΗΣ
ΤΩΝ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ.**

10.1. Εισαγωγή

Κάθε ανθρώπινη δραστηριότητα συνοδεύεται από την παραγωγή αποβλήτων (εικόνα 11). Η έκθεση σε πολλά από τα οποία ενδέχεται να είναι επικίνδυνη για την ανθρώπινη υγεία. Κρίνεται λοιπόν απαραίτητη η επεξεργασία τους πριν από τη διάθεση τους σε κάποιον αποδέκτη (αέρας, νερό, έδαφος). Τα παραγόμενα απόβλητα μπορεί να είναι ως προς τη φύση τους αέρια, υγρά ή στερεά.



Εικόνα 11: Διάθεση των αποβλήτων στο περιβάλλον.

Οι μικροβιακοί και χημικοί παράγοντες που περιέχονται στα υγρά απόβλητα διαταράσσουν την οικολογία του υδάτινου περιβάλλοντος, ρυπαίνοντας τα πόσιμα νερά (επιφανειακά και υπόγεια) και τα είδη διατροφής που προέρχονται από τις θάλασσες και τα ποτάμια με αρνητικές επιπτώσεις για το περιβάλλον και τον άνθρωπο. Γι αυτούς τους λόγους κρίνεται αναγκαία η επεξεργασία των υγρών αποβλήτων πριν από τη διάθεση τους σε έναν υδάτινο αποδέκτη. Η επεξεργασία των υγρών αποβλήτων λαμβάνει χώρα σε Μονάδες Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων (ΜΕΥΑ). Τα λύματα οδηγούνται στις μονάδες αυτές μέσω του συστήματος αποχέτευσης (αποτελούμενο από το δίκτυο υπονόμων), όπου υφίστανται την κατάλληλη επεξεργασία.

10.2. Σκοπός

Σκοπός των πειραμάτων ήταν να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των φίλτρων UV, των PCMs και των PAEs στη ΜΕΥΑ της πόλης των Ιωαννίνων, με την προτεινόμενη μέθοδο **DLLME-SFO**. Το ενδιαφέρον μας επικεντρώθηκε στον έλεγχο (monitoring) της παρουσίας των αναλυτών στην είσοδο (W1), στις εξόδους (W2, W3, W4) καθώς και στο σύστημα της ενεργούς ιλύος (C1, C2) της μονάδας. Επιπλέον, εκτός του προσδιορισμού των επιπέδων των συγκεντρώσεών τους, ελέγχθηκε και το ποσοστό απομάκρυνσης τους κατά την φθινοπωρινή και χειμερινή περίοδο του 2009.

10.3. Πειραματική Διαδικασία

10.3.1. Ανάλυση Δειγμάτων

Η αναλυτική μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των αναλυτών (ADBI, AHMI, Octylsalicylate, ATII, HHCB, AHTN, BBP, HMS, E4360, E6300, OD-PABA, BBP και DOP) ήταν η **DLLME-SFO**. Η ταυτοποίηση και ο προσδιορισμός των ουσιών πραγματοποιήθηκε με αέριο χρωματογράφο (GC-MS), όπως αναφέρεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 9, ενότητα 9.2.

Το ποσοστό απομάκρυνσης των αναλυτών υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση 37:

$$F\% = (C_{in} - C_{out}) \times 100 / C_{in} \quad (37)$$

όπου F το ποσοστό απομάκρυνσης, C_{in} η συγκέντρωση κάθε αναλύτη που εισέρχεται σε κάθε ένα στάδιο του βιολογικού καθαρισμού και C_{out} η συγκέντρωση κάθε αναλύτη που εξέρχεται από κάθε ένα στάδιο.

10.3.2. Προετοιμασία Δειγμάτων

Η συλλογή των δειγμάτων, από τα σημεία ενδιαφέροντος μας, έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρθηκε στην Ενότητα 5.4.3. Για τα υγρά απόβλητα (υδατικά διαλύματα), πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στις 4000 rpm για 5 min, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το υπερκείμενο διάλυμα απομονώθηκε και στη συνέχεια διηθήθηκε (με τη χρήση διηθητικού χαρτιού), λόγω του υψηλού ποσοστού αιωρουμένων στερεών, συλλέγοντας το σε καθαρό δοχείο. Για τα στερεά απόβλητα (ιλύς) η προεργασία που πραγματοποιήθηκε ήταν περισσότερο χρονοβόρα. Τα δείγματα αρχικά φυγοκεντρήθηκαν στις 4000 rpm για 15 min, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ώστε να απομονωθεί το στερεό από το υδατικό τμήμα. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο διάλυμα απομακρύνθηκε ενώ το στερεό υπόλειμμα συλλέχθηκε ώστε να ξηραθεί. Η ξήρανση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε αρχικά στον αέρα, με διήθηση υπό κενό και στην συνέχεια με τη τοποθέτηση των δειγμάτων στο πυριαντήριο στους 35-45 °C για όλη τη νύχτα. Το απαλλαγμένο από την υγρασία δείγμα την επόμενη μέρα, κονιορτοποιήθηκε ώστε να είναι εφικτή η μετέπειτα κατεργασία του.

10.3.3. Σημεία Δειγματοληψίας

Τα σημεία δειγματοληψίας των υγρών αποβλήτων στη ΜΕΥΑ της πόλης των Ιωαννίνων ήταν: W1 στην είσοδο (μετά τις σχάρες), W2 έξοδος πρωτοβάθμιας, W3 έξοδος δευτεροβάθμιας (πριν τη χλωρίωση) και W4 έξοδος, ενώ της ιλύος ήταν: C1 παχυντής πρωτοβάθμιας ιλύς και C2 παχυντής δευτεροβάθμιας ιλύς. Στο σχήμα 53 παρουσιάζονται τα σημεία δειγματοληψίας.

Πίνακας 10.1: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων που ελήφθησαν από την ΜΕΥΑ της πόλης των Ιωαννίνων τους μήνες Νοέμβριο και Δεκέμβριο του 2009.

Μήνες	Σημεία Δειγματοληψίας	pH	Αγωγιμότητα (mS cm ⁻¹)	SS/TS MLSS ^a (mg L ⁻¹)	COD ^b (mg L ⁻¹)	BOD ₅ ^c (mg L ⁻¹)	NH ₄ -N (mg L ⁻¹)	NO ₃ -N (mg L ⁻¹)	VSS/TVS MLVSS ^d (mg L ⁻¹)
Νοέμβριος	Είσοδος (W1)	7.38	0.94	2200.00	3652.00	-	27.50	-	-
	Έξοδος Α' (W2)	7.44	0.90	122.00	269.00	-	27.75	-	-
	Έξοδος Β' (W3)	7.54	0.75	11.00	14.10	3.50	0.13	-	-
	Έξοδος W4)	-	-	-	-	-	-	-	-
	Α' ιλύς (C1)	7.18	-	2.33	-	-	-	-	74.45
	Β' ιλύς (C2)	-	-	-	-	-	-	-	-
Δεκέμβριος	Είσοδος (W1)	7.33	0.97	1930.00	2432.00	-	32.50	-	-
	Έξοδος Α' (W2)	7.43	0.93	150.00	303.00	-	30.75	-	-
	Έξοδος Β' (W3)	7.55	0.77	3.40	16.60	4.30	0.79	5.50	-
	Έξοδος W4)	-	-	-	-	-	-	-	-
	Α' ιλύς (C1)	7.03	-	1.45	-	-	-	-	70.23
	Β' ιλύς (C2)	7.01	-	1.81	-	-	-	-	71.00

^aSS/TS MLSS: ολικά αιωρούμενα στερεά, ^bCOD: χημικά απαιτούμενο οξυγόνο, ^cBOD₅: το βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο, ^dVSS/TVS MLVSS: πτητικά αιωρούμενα στερεά

10.4. Αποτελέσματα Και Συζήτηση

10.4.1. Εφαρμογή Της **DLLME-SFO** Σε Υγρά Απόβλητα

Η **DLLME-SFO** μέθοδος, σύμφωνα με το Κεφάλαιο 9, Ενότητα 9.3.1, εφαρμόστηκε σε δείγματα υγρών αποβλήτων, στην είσοδο και έξοδο της ΜΕΥΑ της πόλης των Ιωαννίνων. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε τον μήνα Μάρτη του 2009 και βρέθηκαν να είναι απαλλαγμένα από τους αναλύτες. Τα δείγματα εμβολιάστηκαν με την κατάλληλη ποσότητα μίγματος αναλυτών ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) και στη συνέχεια επεξεργάστηκαν σύμφωνα με την προτεινόμενη μέθοδο. Η γραμμικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με τον υπολογισμό των σταθερών προσδιορισμού r^2 . Το εύρος της γραμμικής περιοχής των αναλυτών κυμάνθηκε από 1.0 έως $100 \mu\text{g L}^{-1}$ για τα νερά εισόδου και εξόδου, με τις σταθερές προσδιορισμού να είναι μεταξύ του 0.9911 έως 0.9992 και 0.9948 έως 0.9997 , αντίστοιχα. Τα όρια ανίχνευσης (LOD_s), κυμάνθηκαν από 525 έως 1250 ng L^{-1} για το νερό εισόδου και 312 έως 980 ng L^{-1} για το νερό εξόδου. Εν συγκρίσει με τα αποτελέσματα της ίδιας μεθόδου στα φυσικά νερά (Κεφάλαιο 9, Ενότητα 9.3.4, Πίνακας 9.8), το εύρος της γραμμικής περιοχής των συγκεντρώσεων της μεθόδου είναι περιορισμένο ενώ τα όρια ανίχνευσης των ουσιών (LOD_s) είναι αρκετά αυξημένα, γεγονός που ενδεχομένως να οφείλεται στο επιβαρημένο υπόστρωμα των υγρών αποβλήτων [324]. Στον Πίνακα 10.2 παρουσιάζονται αναλυτικά οι περιοχές γραμμικότητας, οι ανακτήσεις ($R\%$), τα όρια ανίχνευσης (LOD_s) και ποσοτικοποίησης (LOQ_s) των αναλυτών ($n=3$) για το νερό εισόδου και εξόδου της ΜΕΥΑ της πόλης των Ιωαννίνων.

Πίνακας 10.2: Περιοχές γραμμικότητας, ανακτήσεις (R%), LOD_s και LOQ_s για τα νερά εισόδου και εξόδου της ΜΕΥΑ.

Αναλύτες	Νερό εισόδου					Νερό εξόδου				
	Π. Γραμμικότητας	r ²	R%	LOD _s	LOQ _s	Π. Γραμμικότητας	r ²	R%	LOD	LOQ _s
	(μg L ⁻¹)			(ng L ⁻¹)	(μg L ⁻¹)	(μg L ⁻¹)			(ng L ⁻¹)	(μg L ⁻¹)
ADBI	2.5-100.0	0.9959	72.2	615	2.10	2.0-100.0	0.9989	88.8	400	1.33
AHMI	2.5-100.0	0.9911	81.3	625	2.18	2.0-100.0	0.9954	95.8	440	1.46
Octylsalicylate	4.5-100.0	0.9990	65.4	1250	4.15	2.5-100.0	0.9965	76.3	615	2.05
ATII	3.0-100.0	0.9985	52.2	780	2.55	2.5-100.0	0.9982	58.2	667	2.23
HHCB	2.5-100.0	0.9991	85.5	650	2.07	2.0-100.0	0.9997	80.2	470	1.57
AHTN	2.0-100.0	0.9992	88.8	530	1.65	1.5-100.0	0.9957	78.9	370	1.24
HMS	2.5-100.0	0.9983	79.8	625	2.23	2.0-100.0	0.9948	87.1	448	1.50
E4360	3.5-100.0	0.9946	88.9	950	3.01	1.5-100.0	0.9994	80.1	350	1.17
E6300	1.0-100.0	0.9984	67.8	250	0.88	1.0-100.0	0.9983	70.5	200	0.67
OD-PABA	2.0-100.0	0.9991	59.9	525	1.70	2.0-100.0	0.9996	72.9	415	1.40
BBP	3.0-100.0	0.9988	64.2	890	2.87	2.7-100.0	0.9965	69.9	780	2.60
DOP	4.5-100.0	0.9980	70.5	1250	4.55	3.5-100.0	0.9978	84.1	980	3.30

10.4.2. Επίπεδα Συγκεντρώσεων Των Επιλεγμένων Αναλυτών Σε Δείγματα Υγρών Αποβλήτων

Σε προηγούμενες ενότητες, είχαμε αναφερθεί στον υδρόφοβο (μη πολικό) χαρακτήρα των επιλεγμένων αναλυτών. Η ιδιότητα τους αυτή, οδηγεί στην βιοσυσσώρευση τους σε ζωντανούς οργανισμούς (ψάρια, μύδια κ.α.) [325] μέσω απελευθέρωσης τους στο υδάτινο περιβάλλον, καθώς και στην προσρόφηση τους από την ενεργή ιλύς (Κεφάλαιο 1). Αυτοί πιθανόν να είναι και οι λόγοι που οι αναλύτες αυτοί ανιχνεύτηκαν, όπως θα δούμε και παρακάτω, σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων στα υγρά απόβλητα. Στον Πίνακα 10.3 που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα επίπεδα συγκεντρώσεων των αναλυτών, για συνολικό αριθμό δειγμάτων $n = 5$, που προέκυψαν από την επεξεργασία των δειγμάτων των υγρών αποβλήτων κατά τους μήνες Νοέμβριο και Δεκέμβριο του 2009, αντίστοιχα.

Πίνακας 10.3: Προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις ($\mu\text{g L}^{-1}$) των επιλεγμένων αναλυτών (n=5) στα σημεία δειγματοληψίας της ΜΕΥΑ της πόλης των Ιωαννίνων, τους μήνες Νοέμβριο και Δεκέμβριο του 2009.

Αναλύτες	Νοέμβριος				Δεκέμβριος			
	W1 Είσοδος	W2	W3	W4 Έξοδος	W1 Είσοδος	W2	W3	W4 Έξοδος
ADBI	-	-	-	-	-	-	-	-
AHMI	-	-	-	-	-	-	-	-
Octylsalicylate	7.45	4.15	4.13	4.12	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
ATII	-	-	-	-	-	-	-	-
HHCB	κ.ο.π.	κ.ο.π.	-	-	κ.ο.π.	κ.ο.π.	-	-
AHTN	κ.ο.π.	κ.ο.π.	-	-	κ.ο.π.	κ.ο.π.	-	-
HMS	-	-	-	-	-	-	-	-
E4360	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	-	-	-	-
E6300	2.93	1.88	1.20	0.99	3.32	2.07	1.34	0.88
OD-PABA	3.68	3.30	2.78	1.88	4.62	3.09	2.23	0.99
BBP	5.16	4.90	4.42	3.01	-	-	-	-
DOP	-	-	-	-	-	-	-	-

κ.ο.π.: κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης, - : δεν ανιχνεύτηκε

Από τα δεδομένα του Πίνακα 10.3, διαπιστώνεται ότι τον μήνα Νοέμβριο του 2009, το 33.3 % των αναλυτών ανιχνεύτηκαν στα δείγματα που ελήφθησαν από την ΜΕΥΑ της πόλης των Ιωαννίνων. Αντίθετα, το ποσοστό αυτό περιορίστηκε τον μήνα Δεκέμβριο του 2009, στο 17.0 %. Επιπλέον, παρατηρούμε ότι οι αναλύτες που ανιχνεύτηκαν ήταν κυρίως τα φίλτρα UV και ο PAEs BBP ενώ δεν ανιχνεύτηκαν οι PCMs. Πιθανόν αυτό να οφείλεται τόσο στον λιπόφιλο χαρακτήρα τους, καθώς έχουν την τάση να προσροφώνται επάνω στα αιωρούμενα στερεά σωματίδια επηρεάζοντας την συγκέντρωσή τους όσο και στην περίοδο λήψης των δειγμάτων.

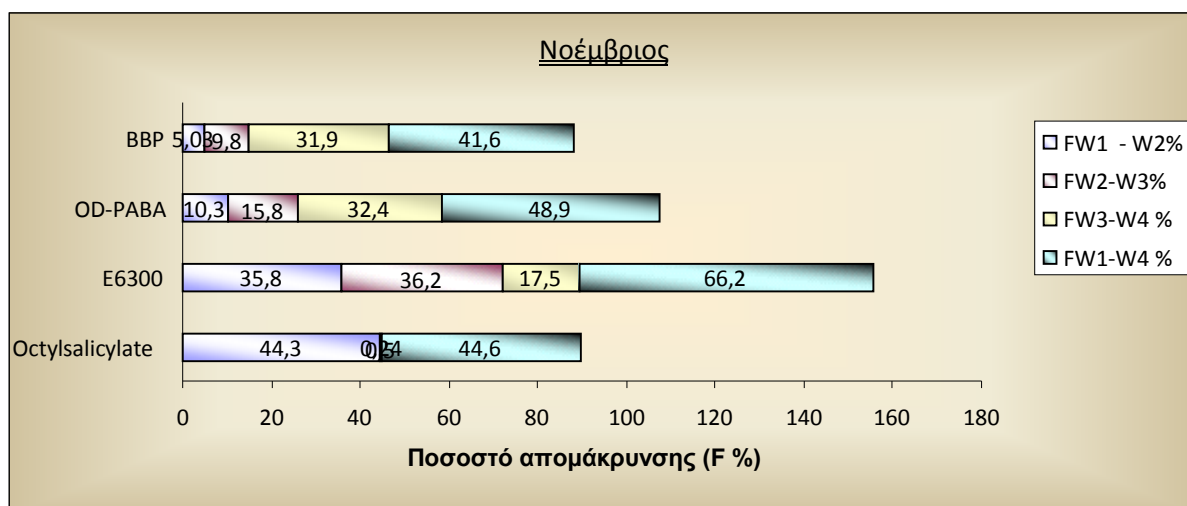
Τον μήνα Νοέμβριο (2009), οι αναλύτες που ανιχνεύτηκαν, στο σύνολο των δειγμάτων, ήταν το octylsalicylate, το E6300, το OD-PABA και το BBP. Οι συγκεντρώσεις τους, στην είσοδο της ΜΕΥΑ, κυμάνθηκαν από 2.93 έως 7.45 $\mu\text{g L}^{-1}$. Την υψηλότερη συγκέντρωση, παρουσίασε το Φίλτρο UV: octylsalicylate με 7.45 $\mu\text{g L}^{-1}$ ακολουθούμενο από τον PAEs: BBP με 5.16 $\mu\text{g L}^{-1}$. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, για την περίπτωση του BBP, έχουν αναφερθεί χαμηλότερες τιμές συγκεντρώσεων από τις ομάδες των C. Dargnat (0.56 έως 4.90 $\mu\text{g L}^{-1}$) [38] και A. D. Vethaak (1.12 $\pm$ 0.54 $\mu\text{g L}^{-1}$) [326]. Σε πιο χαμηλές συγκεντρώσεις ανιχνεύτηκαν τα φίλτρα UV: OD-PABA και E6300. Όσον αφορά το E6300, έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία υψηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεων από τις ερευνητικές ομάδες των Balmer (0.6-6.5 mg L^{-1}) [75] και Buser (2.2-6.5 mg L^{-1}) [327]. Αντίθετα, οι ομάδες των Kurper [131] και Li W. [325] αναφέρουν στις ερευνητικές τους εργασίες παραπλήσια επίπεδα συγκεντρώσεων, 1.17 και 2.13 $\mu\text{g L}^{-1}$, αντίστοιχα. Τέλος, το OD-PABA ανιχνεύθηκε με μέση τιμή συγκεντρώσεων 3.68 $\mu\text{g L}^{-1}$ ενώ σε άλλες έρευνες αναφέρεται κάτω από το όριο ανίχνευσης του [77]. Εν κατακλείδι, τον μήνα Δεκέμβριο (2009) οι αναλύτες που ανιχνεύτηκαν στο σύνολο των δειγμάτων ήταν τα δυο φίλτρα UV: OD-PABA και E6300.

10.4.3. Ποσοστά Απομάκρυνσης Των Επιλεγμένων Αναλυτών Κατά Την Επεξεργασία Των Λυμάτων Στις Εγκαταστάσεις Του Βιολογικού Καθαρισμού

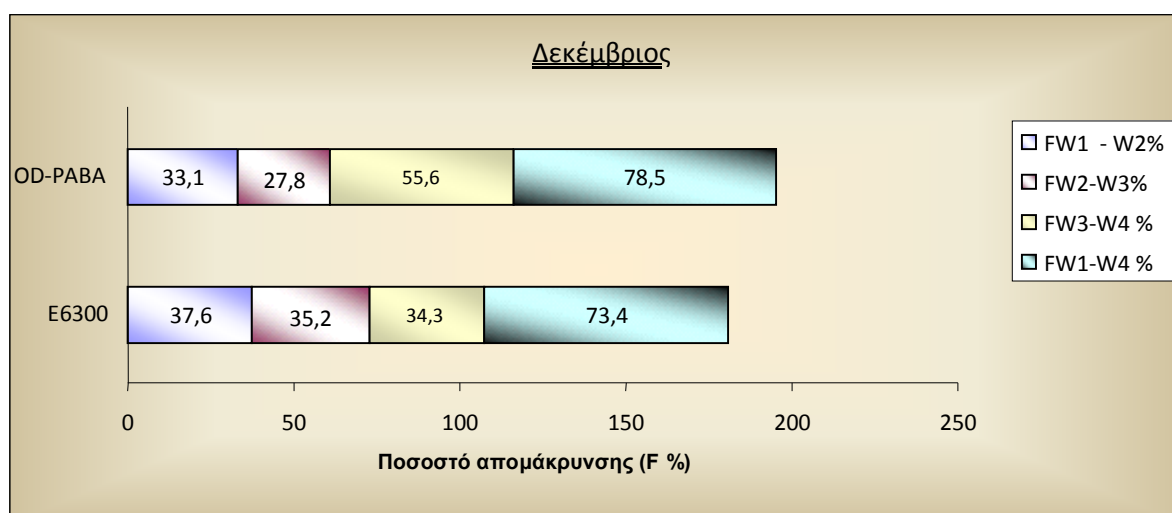
Στις μονάδες εγκατάστασης του βιολογικού καθαρισμού, τα ποσοστά της απομάκρυνσης των οργανικών ρύπων εξαρτώνται από τους παρακάτω δυο παράγοντες: 1) τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ουσίας (διαλυτότητα, πτητικότητα, υδρόφοβος χαρακτήρας κ.τ.λ.) και 2) τον τύπο της επεξεργασίας που υφίστανται τα λύματα στη μονάδα [328]. Στον Πίνακα 10.4 και στα Διαγράμματα 10.1 και 10.2 που ακολουθούν, παρουσιάζονται τα ποσοστά απομάκρυνσης των αναλυτών για κάθε στάδιο του βιολογικού καθαρισμού.

Πίνακας 10.4: Τα ποσοστά απομάκρυνσής (F%) των αναλυτών που ανιχνεύτηκαν στην ΜΕΥΑ της πόλης των Ιωαννίνων για κάθε στάδιο επεξεργασίας, τους μήνες Νοέμβριο και Δεκέμβριο του 2009.

Αναλύτες	Νοέμβριος				Δεκέμβριος			
	F _{W1 - W2}	F _{W2-W3}	F _{W3-W4}	F _{W1-W4}	F _{W1 - W2}	F _{W2-W3}	F _{W3-W4}	F _{W1-W4}
	%	%	%	%	%	%	%	%
Octylsalicylate	44.30	0.50	0.24	44.60	-	-	-	-
E6300	35.80	36.20	17.50	66.20	37.60	35.20	34.30	73.40
OD-PABA	10.30	15.80	32.40	48.90	33.10	27.80	55.60	78.50
BBP	5.03	9.80	31.90	41.60	-	-	-	-



Διάγραμμα 10.1: Γραφική απεικόνιση των ποσοστών απομάκρυνσης (F%) των ανιχνεύσιμων αναλυτών τον μήνα Νοέμβριο του 2009.



Διάγραμμα 10.2: Γραφική απεικόνιση των ποσοστών απομάκρυνσης (F%) των ανιχνεύσιμων αναλυτών τον μήνα Δεκέμβριο του 2009.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα συνολικά ποσοστά απομάκρυνσης (F_{W1-W4} %) κυμαίνονται από 33.3 % για τον PAEs BBP έως 78.5 % για το Φίλτρο UV OD-PABA. Στην περίπτωση του BBP, παραπλήσια τιμή για το ποσοστό απομάκρυνσης έχει αναφερθεί από την ομάδα του Tan (50%) [329]. Το εύρος διακύμανσης των τιμών που παρατηρούνται στα στάδια του βιολογικού καθαρισμού, για κάθε ένα αναλύτη, ενδεχομένως να οφείλεται στην ξεχωριστή δυνατότητα κάθε αναλύτη να

προσροφάται πάνω στα υπάρχοντα στερεά σωματίδια κατά τη διάρκεια επεξεργασίας των λυμάτων [325]. Επιπλέον, οι διαφορές που παρατηρούνται στα ποσοστά απομάκρυνσης αυτών των αναλυτών μεταξύ άλλων ερευνητικών εργασιών, πιθανόν να οφείλονται στις διαφορετικές τιμές συγκεντρώσεων του οργανικού άνθρακα στα υγρά απόβλητα [330].

10.4.4. Επίπεδα Συγκεντρώσεων Και Ποσοστά Απομάκρυνσης Των Επιλεγμένων Αναλυτών Σε Δείγματα Στερεών Αποβλήτων (Ιλύς)

Στον Πίνακα 10.5 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την ανάλυση των δειγμάτων ιλύος σύμφωνα με την προτεινόμενη μέθοδο (**DLLME-SFO**). Διαπιστώνεται ότι στην περίπτωση των στερεών δειγμάτων το ποσοστό των αναλυτών που ανιχνεύτηκαν (συγκρινόμενο με την περίπτωση των υγρών αποβλήτων) ήταν σημαντικά αυξημένο (66%). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην χαμηλή διαλυτότητα τους στην υδατική φάση, στον υδρόφοβο χαρακτήρα των αναλυτών και στην τάση τους να προσροφώνται στη στερεά φάση [49]. Παρατηρώντας τον Πίνακα 10.5, διαπιστώνουμε ότι οι αναλύτες που ανιχνεύτηκαν ήταν πρωτίστως οι PCMs (HHCB, AHTN, ATII, AHMI, ADBI), εν συνεχεία τα φίλτρα UV (Octylsalicylate, HMS, E4360, OD-PABA) και τέλος ο PAEs BBP.

Πίνακας 10.5: Μέσες προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις και ποσοστά απομάκρυνσης (F%) των επιλεγμένων αναλυτών στα σημεία δειγματοληψίας της ΜΕΥΑ της πόλης των Ιωαννίνων, τους μήνες Νοέμβριο και Δεκέμβριο του 2009, σε ξηρό βάρος δείγματος ($\mu\text{g Kg}^{-1} \text{dw}$).

Αναλύτες	Νοέμβριος			Δεκέμβριος		
	Πρ/μια ιλύς	Δευτ/μια ιλύς	F%	Πρ/μια ιλύς	Δευτ/μια ιλύς	F%
	($\mu\text{g Kg}^{-1} \text{dw}$)	($\mu\text{g Kg}^{-1} \text{dw}$)		($\mu\text{g Kg}^{-1} \text{dw}$)	($\mu\text{g Kg}^{-1} \text{dw}$)	
ADBI	1.88	0.63	66.40	2.63	1.41	46.40
AHMI	-	-	-	0.36	-	-
Octylsalicylate	6.74	1.81	73.10	11.69	1.18	89.90
ATII	3.10	1.46	52.90	5.88	0.62	89.40
HHCB	234.70	46.6	80.10	395.50	39.20	90.10
AHTN	56.80	19.1	83.90	82.60	15.00	81.80
HMS	5.98	3.70	38.10	3.89	-	-
E4360	3.77	-	-	5.27	-	-
E6300	-	-	-	-	-	-
OD-PABA	-	-	-	2.87	-	-
BBP	0.79	0.74	6.30	-	-	-
DOP	-	-	-	-	-	-

-: δεν ανιχνεύτηκε

Από τις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν και τους δυο μήνες (Νοέμβριο και Δεκέμβριο του 2009) παρατηρούμε ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις που προσδιορίσθηκαν ήταν για τις PCMs HHCB και AHTN. Η διαπίστωση αυτή έρχεται σε συμφωνία με αρκετές ερευνητικές εργασίες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα [54, 130, 331]. Η Llompart και η ομάδα της [332] αναφέρουν στην

εργασία τους παραπλήσιες τιμές συγκεντρώσεων με αυτές που έχουμε παρουσιάσει στο Πίνακα 9.5 για όλες τις PCMs (ADBI $1.40 \mu\text{g Kg}^{-1}$, ATII $7.00 \mu\text{g Kg}^{-1}$, AHTN $52.00 \mu\text{g Kg}^{-1}$, AHMI $0.27 \mu\text{g Kg}^{-1}$). Αντίθετα, η ερευνητική ομάδα του Dsikowitzky [74] βασιζόμενοι στην υψηλή συγκέντρωση αυτών των αναλυτών, χρησιμοποίησαν την αναλογία HHCB / AHTN για να εκφράσουν ποιοτικά την διαχωριστική τους ικανότητα κατά την επεξεργασία των λυμάτων στις εγκαταστάσεις του βιολογικού καθαρισμού. Επιπλέον, ήταν ένας επιπλέον τρόπος έκφρασης του ποσοστού παραγωγής και χρήσης τους από τον άνθρωπο.

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 10.5, το Νοέμβριο του 2009 η αναλογία HHCB / AHTN βρέθηκε να είναι 4.13 για την πρωτοβάθμια και 2.41 για την δευτεροβάθμια ιλύς ενώ τον Δεκέμβριο οι τιμές βρέθηκαν να είναι 5.44 και 2.61, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα που έχουν αναφερθεί από τις ομάδες των Yang [54] (3.80 έως 6.10) και Y. Horii (3.70 έως 4.90) [59]. Από τα πειραματικά δεδομένα, βρέθηκε ότι η συγκέντρωση της PCM HHCB είναι 4 με 5 φορές μεγαλύτερη από της AHTN. Αξίζει να αναφέρουμε ότι ενώ η χρήση του αναλύτη AHTN έχει απαγορευτεί από το 1992 [333] παρόλα αυτά ανιχνεύεται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, τα ποσοστά απομάκρυνσης κυμάνθηκαν από 80.10 με 90.10 % για το HHCB και από 81.80 με 83.90% για το AHTN. Ο Y. Horii και η ομάδα του [59] αναφέρουν παραπλήσια επίπεδα τιμών (72.00 έως 98.00 %).

Όσον αφορά τους υπόλοιπους αναλύτες που ανιχνεύτηκαν, τα επίπεδα συγκεντρώσεων τους είναι παρεμφερή με αυτά που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι λίγες εργασίες έχουν πραγματοποιηθεί για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των φίλτρων UV σε στερεά απόβλητα. Πιο συγκεκριμένα, για τα φίλτρα UV: E4360, OD-PABA και HMS, η Rosario Rodil και η ομάδα της [334] αναφέρουν παραπλήσια επίπεδα τιμών $6.6 \pm 0.5 \mu\text{g Kg}^{-1}$ για το E4360, 1.4 έως $1.9 \mu\text{g Kg}^{-1}$ για το OD-PABA και υψηλότερες τιμές για το HMS 22 ± 3

$\mu\text{g Kg}^{-1}$. Αντίθετα, στην ερευνητική εργασία του Antonio Nieto και της ομάδας του [65] αναφέρονται υψηλότερες συγκεντρώσεις για το E4360 ($10 \mu\text{g Kg}^{-1}$).

10.5. Συμπεράσματα

Στο παρόν κεφάλαιο έγινε μια προσπάθεια εκτίμησης των επιπέδων συγκέντρωσης και του ποσοστού απομάκρυνσης των επιλεγμένων ουσιών από τις Μονάδες Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων της πόλης των Ιωαννίνων, με την μέθοδο **DLLME-SFO**. Από την μελέτη που πραγματοποιήθηκε, τους μήνες Νοέμβριο και Δεκέμβριο του 2009, στα υγρά και στερεά λύματα ανιχνεύτηκαν αρκετοί από τους αναλύτες. Τα ποσοστά απομάκρυνσης τους κυμάνθηκαν από 41.6 έως 78.5% για την περίπτωση των υγρών αποβλήτων, ενώ για στα στερεά απόβλητα από 6.3 έως 90.1%.

Πιθανές διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται στις συγκεντρώσεις και στα ποσοστά απομάκρυνσης των αναλυτών συγκρινόμενα με άλλες ερευνητικές εργασίες, ενδεχομένως να οφείλονται στο μέγεθος των μονάδων του βιολογικού καθαρισμού, στον πληθυσμό που μπορεί να εξυπηρετεί, στην διαφορετική σύσταση των λυμάτων (ιλύος και υδάτων), στην συγκέντρωση του οργανικού άνθρακα καθώς και στις εκάστοτε μεθόδους επεξεργασίας που χρησιμοποιούνται [330].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο πλαίσιο της παρούσας Διατριβής αναπτύχθηκαν δυο νέες αναλυτικές μέθοδοι. Η **υγρή υγρή μικροεκχύλιση διασποράς (DLLME)** και η **υγρή υγρή μικροεκχύλιση διασποράς βασιζόμενη στην στερεοποίηση της επιπλέουσας οργανικής φάσης (DLLME-SFO)**.

Οι μέθοδοι εφαρμόστηκαν σε μίγματα αναλυτών της κατηγορίας των Προϊόντων Προσωπικής Περιποίησης (φίλτρα UV, πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις (PCMs) και φθαλικοί εστέρες (PAEs)), σε διαφορετικά υποστρώματα (επιφανειακά ύδατα, εδάφη και σε υγρά και στερεά απόβλητα των Μονάδων Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων). Η επεξεργασία τους έγινε χρησιμοποιώντας αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματογράφο μάζας (GC-MS) και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας (HPLC/UV-DAD). Ο έλεγχος των κυριότερων παραμέτρων που επηρεάζουν την απόκριση των **DLLME** και **DLLME-SFO** μεθόδων καθώς και η βελτιστοποίηση τους επιτεύχθηκε με την εφαρμογή *χημειομετρικών μεθόδων*.

DLLME

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή αρχικά εφαρμόστηκε η μέθοδος **DLLME** σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας (**HPLC/UV-DAD**) για τον προσδιορισμό των φίλτρων UV σε επιφανειακά ύδατα και σε δείγματα εδάφους.

❖ ΦΙΛΤΡΑ UV ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΎΔΑΤΑ

Αρχικά, αναπτύχθηκε ο πειραματικός σχεδιασμός διαλογής 2^{7-4} Plackett–Burman, ώστε να προσδιοριστούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόκριση της μεθόδου. Τα αποτελέσματα έδειξαν τους παράγοντες: χρόνος φυγοκέντρωσης, όγκος του διαλύτη διασποράς και όγκος του διαλύτη εκχύλισης, να είναι οι πιο σημαντικοί (διάστημα εμπιστοσύνης 95%). Αυτοί, στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας, βελτιστοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τον 2^3 κλασματικό πειραματικό σχεδιασμό

(CCD). Στο υπό μελέτη σύστημα παρατηρήθηκαν επιδράσεις πρώτου και δευτέρου βαθμού καθώς και αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους παράγοντες. Η πρώτη αλληλεπίδραση παρατηρήθηκε ανάμεσα στους όγκους των διαλυτών εκχύλισης και διασποράς ενώ η δεύτερη ανάμεσα στον όγκο του διαλύτη διασποράς και τον χρόνο φυγοκέντρωσης. Αναλύοντας κατόπιν τα δεδομένα που προέκυψαν από τον πειραματικό σχεδιασμό (CCD) σε συνδυασμό με την μέθοδο της επιθυμητής συνάρτησης (desirability function), προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες, που μεγιστοποιούν την ανάκτηση της μεθόδου, για το υπό μελέτη σύστημα. Συνοψίζοντας, η μέγιστη ανάκτηση της μεθόδου (μέσος όρος των ανακτήσεων, R%) υπολογίστηκε στα 82.02% ενώ οι βέλτιστες τιμές για κάθε παράμετρο βρέθηκαν να είναι : CH₃CN 2.07 ml, C₂Cl₄ 51.6 μL, και χρόνος φυγοκέντρωσης 8.5 min.

Στη συνέχεια η μέθοδος (**DLLME**) επικυρώθηκε σε νερό πηγής εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν από την πειραματική διαδικασία. Τα όρια ανίχνευσης (LOD_s) κυμάνθηκαν από 60.6 έως 605 ng L⁻¹ ενώ οι ανακτήσεις από 77.5 % έως 87.2 % για όλα τα φίλτρα UV. Μετά τα στάδια βελτιστοποίησης και επικύρωσης, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δυο διαφορετικούς τύπους υδάτων (θαλασσινό και ποτάμιο). Συγκρίνοντας τις ανακτήσεις που προέκυψαν για τους τρεις τύπους νερού (πηγής, θαλασσινό και ποτάμιο) παρατηρήθηκε μικρή μείωση αυτών, από το νερό πηγής στο θαλασσινό και στη συνέχεια στο ποτάμιο νερό. Η συμπεριφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στην αύξηση της οργανικής ύλης με την ίδια σειρά. Ενδεικτικά, παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από την DLLME μέθοδο και για τα τρία δείγματα ύδατος (Πίνακας 11.1).

Πίνακας 11.1. Οι ανακτήσεις (R%) και οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) σε νερά πηγής, θαλασσινό και ποτάμιο.

Αναλύτες	Νερό Πηγής	Νερό Θάλασσας	Νερό Ποταμού
	Ανάκτηση (R%) (RSD %)	Ανάκτηση (R%) (RSD %)	Ανάκτηση (R%) (RSD %)
E6300	82.7 (1.6)	81.5 (7.9)	80.6 (2.5)
E9020	87.2 (2.3)	85.2 (8.2)	84.2 (9.3)
E4360	77.5 (2.6)	75.8 (4.6)	70.2 (7.9)
HMS	84.5 (9.7)	80.8 (7.3)	78.6 (2.4)
OD-PABA	79.4 (0.5)	77.2 (11.3)	76.9 (7.2)
Octylsalicylate	82.6 (6.6)	82.1 (10.6)	80.6 (1.6)

❏ ΦΙΛΤΡΑ UV ΣΕ ΕΔΑΦΗ

Τα εδάφη ως σύνθετα υποστρώματα που είναι, υπόκεινται σε συστηματικές επιδράσεις περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο υπόστρωμα. Γι αυτό το λόγω, η πολύ-παραγοντική μέθοδος που εφαρμόστηκε, αποσκοπούσε στην βελτιστοποίηση επιλεγμένων παραγόντων που πιθανόν να επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ο πειραματικός σχεδιασμός 2^{7-4} Plackett–Burman, διαπιστώνοντας ότι οι παράγοντες: ποσότητα εδάφους, όγκος CH_3CN και χρόνος παραμονής του δείγματος στο λουτρό υπερήχων, επιδρούν σημαντικά στην απόκριση της μεθόδου. Η βελτιστοποίηση τους, πραγματοποιήθηκε με τον κλασματικό πειραματικό σχεδιασμό σε συνδυασμό με τη μέθοδο της επιθυμητής συνάρτησης. Από τα αποτελέσματα που εξήχθησαν, η μέγιστη ανάκτηση της μεθόδου (μέσος όρος των ανακτήσεων, R%) υπολογίστηκε στα 72% ενώ οι βέλτιστες τιμές για κάθε παράμετρο βρέθηκαν να είναι, ο χρόνος παραμονής του δείγματος στο λουτρό υπερήχων 20 min, ο όγκος του CH_3CN 4 mL και η ποσότητα του εδάφους 0.58 gr. Στη συνέχεια, η μέθοδος επικυρώθηκε σε δείγματα εδάφους που πάρθηκαν

από την περιοχή της Ηπείρου, εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν. Τα όρια ανίχνευσης (LOD_s) κυμάνθηκαν από 0.31 έως 2.25 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, ενώ οι ανακτήσεις από 65.1 έως 77.9%, για όλα τα φίλτρα UV. Μετά τα στάδια βελτιστοποίησης και επικύρωσης, η προτεινόμενη μέθοδος εφαρμόστηκε σε δυο διαφορετικούς τύπους εδάφους, από την περιοχή της Πρέβεζας και της Κοζάνης. Οι τιμές των ανακτήσεων (R%) για τα δείγματα από την περιοχή της Κοζάνης και της Πρέβεζας είναι υψηλότερες συγκριτικά με αυτές που παρατηρήθηκαν για την περιοχή της Ηπείρου ($R_{\text{Κοζάνη}}\% > R_{\text{Πρέβεζα}}\% > R_{\text{Ηπείρου}}\%$). Αυτό οφείλεται στις σημαντικές διαφορές που παρατηρούνται στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών (Πίνακας 5.2). Ενδεικτικά, παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από την DLLME μέθοδο και για τους τρεις διαφορετικούς τύπους εδαφών (Πίνακας 11.2).

Πίνακας 11.2. Οι ανακτήσεις (R%) και οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) σε δείγματα εδάφους.

	Ήπειρος	Πρέβεζα	Κοζάνη
Αναλύτες	Ανάκτηση (R%) (RSD%)	Ανάκτηση (R%) (RSD%)	Ανάκτηση (R%) (RSD%)
E6300	68.0 (7.0)	78.0 (10.1)	96.0 (8.8)
E4360	65.1 (4.3)	72.4 (3.3)	80.4 (2.5)
HMS	70.9 (11.2)	72.4 (7.8)	75.6 (3.3)
OD-PABA	77.9 (8.7)	78.4 (3.9)	82.4 (8.1)
Octylsalicylate	71.2 (7.5)	70.0 (8.2)	76.0 (13.1)

☞ PCMs ΚΑΙ PAEs ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΥΔΑΤΑ

Συνεχίζοντας την πειραματική διαδικασία, η **DLLME** μέθοδος σε συνδυασμό με την αέρια χρωματογραφική τεχνική (GC-MS), εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των PCMs και PAEs σε επιφανειακά ύδατα και δείγματα εδάφους. Στην περίπτωση των επιφανειακών υδάτων, οι παράγοντες που βρέθηκαν να επηρεάζουν την απόκριση της μεθόδου ήταν ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης (CCl_4), ο όγκος του διαλύτη διασποράς (MeOH) και ο χρόνος φυγοκέντρησης. Οι παράγοντες βελτιστοποιήθηκαν με τον κλασματικό πειραματικό σχεδιασμό 2^3 , από τα αποτελέσματα που εξήχθησαν, η μέγιστη ανάκτηση της μεθόδου βρέθηκε να είναι 86.7 %, με τις βέλτιστες τιμές για κάθε παράμετρο να είναι: ο όγκος της MeOH 0.62 mL, ο όγκος του CCl_4 250 μL και ο χρόνος φυγοκέντρησης 7.5 min. Η επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε σε νερό πηγής εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν. Τα όρια ανίχνευσης (LOD_s) κυμάνθηκαν από 8 έως 63 ng L^{-1} ενώ οι ανακτήσεις από 69.4 % έως 98.4 %, για όλους τους αναλύτες (Πίνακας 11.3).

☞ PCMs ΚΑΙ PAEs ΣΕ ΕΔΑΦΗ

Για τα δείγματα εδάφους (στερεά υποστρώματα), η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια με τα φίλτρα UV. Οι παράγοντες που βρέθηκαν να επηρεάζουν την απόκριση, σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό 2^{7-4} Plackett–Burman, ήταν ο όγκος της MeOH , η θερμοκρασία και ο χρόνος παραμονής του δείγματος στο λουτρό υπερήχων. Από τα αποτελέσματα που εξήχθησαν, η μέγιστη ανάκτηση της μεθόδου υπολογίστηκε στα 83% με τις βέλτιστες τιμές για κάθε παράμετρο να είναι: ο όγκος της MeOH 5.52 mL, ο χρόνος παραμονής του δείγματος στο λουτρό υπερήχων 20 min και η θερμοκρασία των υπερήχων 42.6°C. Η επικύρωση της μεθόδου ελέγχθηκε σε δείγματα εδάφους από την περιοχή της Κοζάνης εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν. Οι ανακτήσεις, για όλους του αναλύτες, κυμάνθηκαν σε ικανοποιητικά επίπεδα από 73.7 έως 90.9% με τα όρια ανίχνευσης (LOD_s) να είναι από 25.1 έως 125 ng Kg^{-1} (Πίνακας 11.3).

Πίνακας 11.3 Οι τιμές των ανακτήσεων (R%) για τις PCMs και PAEs, σε νερό πηγής και σε δείγμα εδάφους με την DLLME μέθοδο.

Αναλύτες	Νερό Πηγής	Έδαφος
	R% (RSD %)	R% (RSD %)
ADBI	89.4 (10.6)	90.9 (8.1)
AHMI	89.9 (9.4)	85.7 (5.5)
ATII	93.5 (11.9)	87.7 (3.2)
HHCB	98.4 (10.9)	89.8 (10.0)
AHTN	87.7 (14.6)	87.9 (4.9)
BBP	74.0 (9.3)	73.7 (1.9)
DOP	69.4 (5.5)	77.5 (8.4)

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν και για τα δυο μίγματα αναλυτών, διαπιστώθηκαν μικρότερες τιμές ανακτήσεων (R%) και υψηλότερα όρια ανίχνευσης (LODs) στην περίπτωση του στερεού υποστρώματος (έδαφος). Το εξαγόμενο συμπέρασμα ήταν αναμενόμενο, καθώς τα εδάφη ως πολυσύνθετα υποστρώματα που είναι, παρεμποδίζουν την εκχύλιση των επιλεγμένων αναλυτών. Αυτή η συμπεριφορά τείνει σε χαμηλότερες τιμές ανακτήσεων καθώς και υψηλότερα όρια ανίχνευσης.

Συνοψίζοντας και ως απόρροια των αποτελεσμάτων, η **DLLME** αναλυτική μεθοδολογία είναι ταχύτερη, παρέχοντας υψηλή ευαισθησία με χαμηλό κόστος. Μπορεί να εφαρμοστεί ικανοποιητικά στην ποσοτική ανάλυση των φίλτρων UV, PCMs και PAEs σε πραγματικά υδατικά δείγματα καθώς και σε δείγματα εδάφους, επιτρέποντας την χρήση της σε αναλύσεις ρουτίνας.

DLLME – SFO

Ολοκληρώνοντας την εκτενή μελέτη της **DLLME** μεθόδου, προβήκαμε στην επιλογή της αναλυτικής μεθόδου **DLLME-SFO**, για το επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας. Η επιλογή της έγινε στοχεύοντας στην αντικατάσταση των επιβλαβών και ιδιαίτερα τοξικών διαλυτών εκχύλισης, που χρησιμοποιούνται στην **DLLME**, με άλλους χαμηλότερης τοξικότητας (π.χ. 1-δωδεκανόλη). Η **DLLME-SFO** μέθοδος εφαρμόστηκε σε επιφανειακά ύδατα και για τα δυο μίγματα αναλυτών, φίλτρα UV και PCMs/PAEs

☒ ΦΙΛΤΡΑ UV, PCMs ΚΑΙ PAEs ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΥΔΑΤΑ

Για το πρώτο μίγμα αναλυτών (φίλτρα UV), οι παράγοντες που βρέθηκαν να επηρεάζουν την απόκριση της μεθόδου, σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό 2^{7-4} Plackett–Burman, ήταν ο όγκος της ακετόνης, ο όγκος της 1-δωδεκανόλης (1-DD-OH) και η ιοντική ισχύς. Από την πειραματική διαδικασία βελτιστοποίησης (CCD) παρατηρήθηκαν δυο αλληλεπιδράσεις, η πρώτη ανάμεσα στον όγκο της 1-δωδεκανόλης (1-DD-OH) και στον όγκο της ακετόνης και η δεύτερη ανάμεσα στον όγκο της 1-DD-OH και στην ιοντική ισχύ. Από τα αποτελέσματα που εξήχθησαν, η μέγιστη ανάκτηση της μεθόδου (μέσος όρος των ανακτήσεων, R%) υπολογίστηκε στα 87.7%, με τις βέλτιστες τιμές για κάθε παράμετρο να είναι 251 μL 1-DD-OH, 0.664 mL ακετόνης και 2.42% w/v NaCl. Η μέθοδος επικυρώθηκε σε νερό πηγής εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν. Οι ανακτήσεις, για όλους του αναλύτες, κυμάνθηκαν από 77.1 έως 101.7 %, με τα όρια ανίχνευσης (LOD_s) να είναι από 62.5 έως 260 ng L^{-1} .

Για το δεύτερο μίγμα αναλυτών (PCMs και PAEs), η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ανάλογη με την προαναφερθείσα. Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν για περαιτέρω διερεύνηση ήταν ο όγκος της 1-ενδεκανόλης (1-UD-OH), ο όγκος της ακετόνης και ο χρόνος φυγοκέντρωσης. Στη συνέχεια, λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού (CCD), προσδιορίστηκαν οι

βέλτιστες συνθήκες χρησιμοποιώντας την μέθοδο της επιθυμητής συνάρτησης (desirability function). Από τα αποτελέσματα, η μέγιστη ανάκτηση της μεθόδου υπολογίστηκε στα 102%, με τις βέλτιστες τιμές για κάθε παράμετρο να είναι 200 μL 1-UD-OH, 1.33 mL ακετόνης και 12 min ο χρόνος φυγοκέντρωσης. Η μέθοδος επικυρώθηκε σε νερό πηγής εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν. Οι ανακτήσεις, για όλους του αναλύτες, κυμάνθηκαν από 96.1 έως 118.0 %, με τα όρια ανίχνευσης (LOD_5) να είναι από 62.5 έως 500.0 ng L^{-1} .

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ DLLME ΚΑΙ DLLME-SFO ΜΕΘΟΔΩΝ

Συνεχίζοντας, τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από τις δυο αναλυτικές μεθόδους (**DLLME** και **DLLME-SFO**), συγκρίθηκαν ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Στα δυο μίγματα αναλυτών, εφαρμόστηκε αρχικά το *F-test* και εν συνεχεία το *t-test*. Για τα φίλτρα UV, η τιμή $F_{\text{πειραματική}}$ βρέθηκε 2.43 και συγκρίθηκε με την τιμή $F_{\text{θεωρητική}} = 5.05$ (Πίνακα 3.2, Κεφάλαιο 3), για διάστημα εμπιστοσύνης 95% και για πέντε βαθμούς ελευθερίας, συμπεραίνοντας ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των διακυμάνσεων μεταξύ των δυο μεθόδων, για το προαναφερθέν διάστημα εμπιστοσύνης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η δοκιμή σημαντικότητας *t* (*t-test*). Από τα αποτελέσματα, η τιμή $t_{\text{πειραματική}}$ βρέθηκε 0.6013 και συγκρίθηκε με την $t_{\text{θεωρητική}} = 2.45$, για διάστημα εμπιστοσύνης 95% και για έξι βαθμούς ελευθερίας, συμπεραίνοντας ότι δεν υπάρχει στατιστικά, σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο μεθόδων για το προαναφερθέν διάστημα εμπιστοσύνης. Όμοια αποτελέσματα ελήφθησαν και στην περίπτωση των PCMs και PAEs, ($F_{\text{πειραματική}} < F_{\text{θεωρητικό}}$, $2.03 < 5.05$ και $t_{\text{πειραματικό}} < t_{\text{θεωρητικό}}$, $0.97 < 2.78$).

Καταλήγοντας συμπεραίνουμε ότι τα αποτελέσματα των δυο μεθόδων, **DLLME** και **DLLME-SFO**, δεν διαφέρουν μεταξύ τους σημαντικά. Η **DLLME-SFO** μέθοδος όμως παρουσιάζει κάποια βασικά πλεονεκτήματα έναντι της **DLLME**:

- ☞ χρησιμοποιούνται διαλύτες εκχύλισης (π.χ. 1-DD-OH, 1-UD-OH) μικρής τοξικότητας σε σχέση με τους αλογονομένους διαλύτες CCl₄, C₂Cl₄.
- ☞ ο διαλύτης εκχύλισης απομακρύνεται ευκολότερα από την υδατική φάση με το στάδιο της στερεοποίησης του, λαμβάνοντας υψηλότερες τιμές ανακτήσεων (R%) και χαμηλότερα όρια ανίχνευσης (LOD_s).

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ DLLME-SFO ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΟ ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΜΙΓΜΑ ΑΝΑΛΥΤΩΝ

Λαμβάνοντας υπόψη τα πλεονεκτήματα της **DLLME-SFO** έναντι της **DLLME**, η **DLLME-SFO** επιλέχθηκε να εφαρμοστεί σε ένα συνολικό μίγμα αναλυτών (φίλτρα UV, PCMs και PAEs) στοχεύοντας στην βελτιστοποίηση και στην μετέπειτα εφαρμογή της στις Μονάδες Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων (ΜΕΥΑ) της πόλης των Ιωαννίνων.

ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΎΔΑΤΑ

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ο 2⁷⁻⁴ πειραματικός σχεδιασμός αξιολόγησης Plackett–Burman, διαπιστώνοντας ότι ο όγκος της ακετόνης, ο όγκος της 1-DD-OH και η ιοντική ισχύς επηρεάζουν την απόκριση της μεθόδου. Η βελτιστοποίηση των προαναφερθέντων παραγόντων πραγματοποιήθηκε με τον πειραματικό σχεδιασμό βελτιστοποίησης σε συνδυασμό με την συνάρτηση επιθυμίας. Σ' αυτή την περίπτωση ως μετρήσιμη απόκριση επιλέχθηκε η μέση τιμή των ανακτήσεων των αναλυτών για κάθε σειρά πειραμάτων (R%) και η σχετική τυπική απόκλιση της μέσης τιμής των ανακτήσεων. Η βέλτιστη περιοχή των πειραματικών συνθηκών για την **DLLME-SFO** επιλέχθηκε να αντιστοιχεί στην υψηλότερη δυνατή μέση τιμή της ανάκτησης (R%) και στην ταυτόχρονη χαμηλότερη δυνατή τιμή της σχετικής τυπικής απόκλισης των ανακτήσεων (RSD%). Η επιλογή των δυο μετρήσιμων αποκρίσεων (R% και RSD%) για το σύνολο των αναλυτών πραγματοποιήθηκε για την αποφυγή επιλογής βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης που θα μπορούσαν να είναι παραπλανητικές για το σύνολο των αναλυτών. Λαμβάνοντας έτσι υπόψη την σχετική

τυπική απόκλιση (RSD%), ώστε αυτή να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη, προσπαθήσαμε να αποφύγουμε τέτοιες καταστάσεις [318]. Η μέγιστη ανάκτηση (R%) της μεθόδου υπολογίστηκε στα 82.2%, με τις βέλτιστες τιμές για κάθε παράμετρο να είναι 251 μ L 1-DD-OH, 0.65 mL ακετόνης και 2.5 % w/v η ιοντική ισχύς.

✎ ΕΔΑΦΗ

Στην περίπτωση του στερεού υποστρώματος, εφαρμόστηκε ο 2^{7-4} πειραματικός σχεδιασμός αξιολόγησης Plackett–Burman, με τους παράγοντες έδαφος και όγκος ακετόνης να επηρεάζουν την απόκριση της μεθόδου. Στη συνέχεια οι παράγοντες βελτιστοποιήθηκαν με ένα 2^2 πειραματικό σχεδιασμό βελτιστοποίησης. Από τα αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού (CCD) και χρησιμοποιώντας την μέθοδο της επιθυμητής συνάρτησης (desirability function), προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες. Η μέγιστη ανάκτηση (R%) της μεθόδου υπολογίστηκε στο 80.3 %, με τις βέλτιστες τιμές για κάθε παράμετρο να είναι 6.12 mL ακετόνης και 0.705 gr εδάφους.

✎ ΜΟΝΑΔΕΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ (ΜΕΥΑ)

Σε αυτό το στάδιο της εργασίας έγινε μια προσπάθεια εκτίμησης των επιπέδων συγκέντρωσης και του ποσοστού απομάκρυνσης των επιλεγμένων ουσιών από τις Μονάδες Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων της πόλης των Ιωαννίνων, με την μέθοδο **DLLME-SFO**, για τους μήνες Νοέμβριο και Δεκέμβριο του 2009. Στα δείγματα των υγρών αποβλήτων που ελήφθησαν τον Νοέμβριο του 2009, ανιχνεύτηκε το 42% των αναλυτών ενώ το ποσοστό αυτό περιορίστηκε τον μήνα Δεκέμβριο του 2009, στο 17%. Οι αναλύτες που ανιχνεύτηκαν ήταν τα φίλτρα UV: octylsalicylate, E6300, OD-PABA και ο PAEs: BBP ενώ δεν ανιχνεύτηκαν οι PCMs. Πιθανόν αυτό να οφείλεται τόσο στον λιπόφιλο χαρακτήρα τους, καθώς έχουν την τάση να προσροφώνται επάνω στα αιωρούμενα στερεά σωματίδια επηρεάζοντας την συγκέντρωσή τους όσο

και στην περίοδο λήψης των δειγμάτων. Σύμφωνα με έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί [54], το ποσοστό συγκέντρωσης τους έχει βρεθεί να μειώνεται κατά τη διάρκεια των ψυχρών μηνών. Τα συνολικά ποσοστά απομάκρυνσης (F_{W1-W4} %) βρέθηκαν να κυμαίνονται από 41.6% για τον ΠΑΕ ΒΒΡ έως 78.5 % για το Φίλτρο UV OD-PABA.

Στην περίπτωση των στερεών δειγμάτων (ιλύς) το ποσοστό των αναλυτών που ανιχνεύτηκαν (συγκρινόμενο με την περίπτωση των υγρών αποβλήτων) ήταν σημαντικά αυξημένο (66%). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην χαμηλή διαλυτότητα των αναλυτών στην υδατική φάση, στον υδρόφοβο χαρακτήρα τους και στην τάση τους να προσροφώνται στη στερεά φάση. Οι αναλύτες που ανιχνεύτηκαν ήταν οι PCMs: HHCB, AHTN, ATII, AHMI, ADBI, τα φίλτρα UV: Octylsalicylate, HMS, E4360, OD-PABA και ο ΠΑΕs ΒΒΡ.

Συνοψίζοντας, η **DLLME-SFO** μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία, για το συνολικό μίγμα αναλυτών, σε επιφανειακά ύδατα, στερεά υποστρώματα (εδάφη) καθώς και στις Μονάδες Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων της πόλης των Ιωαννίνων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μέχρι σήμερα, οι παραδοσιακές αναλυτικές μεθοδολογίες χαρακτηρίζονται για το υψηλό κόστος και τους μεγάλους όγκους τοξικών οργανικών διαλυτών που απαιτούνται. Η διαπίστωση αυτή έμελλε να αποτελέσει και το εφαλτήριο για την ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθόδων, υψηλής ευαισθησίας και ταχείας εφαρμογής. Αυτοί ήταν και οι λόγοι για τους οποίους στην παρούσα Διατριβή επιλέχθηκαν να μελετηθούν λεπτομερώς δυο νέες αναλυτικές μέθοδοι, η **υγρή υγρή μικροεκχύλιση της διασποράς (DLLME)** και η **υγρή υγρή μικροεκχύλιση της διασποράς βασισόμενη στην στερεοποίηση της επιπλέουσας οργανικής φάσης (DLLME-SFO)**.

Οι αναλυτικές μέθοδοι, **DLLME** και **DLLME-SFO**, εφαρμόστηκαν σε μίγματα αναλυτών της κατηγορίας των Προϊόντων Προσωπικής Περιποίησης, αντιηλιακών παραγόντων (φίλτρα UV), πολυκυκλικών αρωματικών ενώσεων (PCMs) και φθαλικών εστέρων (PAEs). Η επιλογή των αναλυτών: Celestolide (ADBI), Galaxolide (HHCB), Tonalide (AHTN), Phantolide (AHMI), Traseolide (ATII), Benzyl butyl phthalate (BBP), Di-*n*-octyl phthalate (DOP) Eusolex 4360, Eusolex 6300, Eusolex 9020, Octyl salicylate, Eusolex Homosalate και Eusolex 6007 (OD-PABA) έγινε με κύριο γνώμονα την **ευρεία χρήση** τους από την βιομηχανία των καλλυντικών (σαμπουάν, αφρόλουτρα, αρώματα) και τον άνθρωπο, την **ύπαρξη τους στο περιβάλλον** και τέλος τον χαρακτηρισμό τους ως **αναδυόμενους ρύπους**.

Οι αναλύτες χωρίστηκαν σε τρία μίγματα: α) στα φίλτρα UV (μίγμα 1), β) στις πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις (PCMs) με τους φθαλικούς εστέρες (PAEs) (μίγμα 2) και γ) σε ένα συνολικό μίγμα (μίγμα 3). Τα μίγματα αναλυτών 1 και 2 χρησιμοποιήθηκαν για τον πειραματικό σχεδιασμό, την εργαστηριακή ανάπτυξη και εφαρμογή των **DLLME** και **DLLME-SFO** μεθόδων σε επιφανειακά ύδατα και στερεά υποστρώματα (εδάφη). Το μίγμα αναλυτών 3, χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της **DLLME-SFO** σε επιφανειακά ύδατα, στερεά υποστρώματα (εδάφη) και σε υγρά και στερεά απόβλητα των Μονάδων Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων της πόλης των Ιωαννίνων. Η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των αναλυτών στα δείγματα έγινε χρησιμοποιώντας Αέριο Χρωματογράφο συζευγμένο με

Φασματογράφο Μάζας (GC-MS) και Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης συζευγμένη με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας (HPLC/UV-DAD).

Πολλοί είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόκριση των μεθόδων, **DLLME** και **DLLME-SFO**, όπως για παράδειγμα ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης, ο όγκος του διαλύτη διασποράς, η αλατότητα και ο χρόνος εκχύλισης. Γι αυτό το λόγο, οι παράγοντες βελτιστοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τον Πειραματικό Σχεδιασμό Βελτιστοποίησης. Αρχικά, εφαρμόσθηκε ο σχεδιασμός Plackett – Burman ώστε να επιλεγούν οι σημαντικοί παράγοντες και στη συνέχεια, βελτιστοποιήθηκαν εφαρμόζοντας τον κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (CCD). Στο τελικό στάδιο, χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση επιθυμίας (desirability function) για την ταυτόχρονη βελτιστοποίηση όλων των επιδρώντων παραγόντων ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή ανάκτηση.

Μετά το στάδιο βελτιστοποίησης των **DLLME** και **DLLME-SFO** μεθόδων, πραγματοποιήθηκε η μεταξύ τους σύγκριση, χρησιμοποιώντας το *F-test* και το *t-test*. Η επεξεργασία των δεδομένων υπέδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά, σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο μεθόδων, για διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Η **DLLME-SFO** μέθοδος όμως παρουσιάζει κάποια βασικά πλεονεκτήματα έναντι της **DLLME**:

- ☞ χρησιμοποιούνται διαλύτες εκχύλισης (π.χ. 1-DD-OH, 1-UD-OH) μικρής τοξικότητας σε σχέση με τους αλογονομένους διαλύτες CCl₄, C₂Cl₄.
- ☞ ο διαλύτης εκχύλισης απομακρύνεται ευκολότερα από την υδατική φάση με το στάδιο της στερεοποίησης του, λαμβάνοντας υψηλότερες τιμές ανακτήσεων (R%) και χαμηλότερα όρια ανίχνευση (LOD_s).

Για τους ανωτέρω λόγους, η **DLLME-SFO** μέθοδος επιλέχθηκε να εφαρμοστεί στο συνολικό μίγμα αναλυτών (φίλτρα UV, PCMs και PAEs) στοχεύοντας στην βελτιστοποίηση και στην μετέπειτα εφαρμογή της, στις Μονάδες Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων (ΜΕΥΑ) της πόλης των Ιωαννίνων, αποσκοπώντας στην ανίχνευση και τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των αναλυτών σε αστικά υγρά και στερεά απόβλητα.

Συνοψίζοντας και έχοντας πάντα ως γνώμονα και μέσο αναφοράς την αναγκαιότητα ανάπτυξης νέων αναλυτικών μεθόδων υψηλής ευαισθησίας, ταχείας εφαρμογής και φυσικά φιλικών προς το περιβάλλον, θα πρέπει να επισημάνουμε ότι οι δυο νέες αναλυτικές μέθοδοι, **DLLME** και **DLLME-SFO**, που εφαρμόστηκαν σε επιφανειακά ύδατα και εδάφη, δίνουν αξιόπιστα αποτελέσματα, σε μικρό χρόνο, χρησιμοποιώντας μικρούς όγκους διαλυτών, καθιστώντας δυνατή τη χρήση τους σε αναλύσεις ρουτίνας. Η μεταξύ τους σύγκριση, δίνει το πλεονέκτημα στην **DLLME-SFO**, καθώς είναι περιβαλλοντικά φιλικότερη, παρέχοντας υψηλότερες τιμές ανακτήσεων και χαμηλότερα όρια ανίχνευσης επιτρέποντας την εφαρμογή της σε αναλύσεις ρουτίνας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13

SUMMARY

Traditional methods for sample preparation including liquid-liquid extraction, soxhlet extraction, chromatography, distillation, and absorption, usually suffer from the disadvantages of time-consuming, large amounts of toxic organic solvent to be used and difficulty in automation to some extent. For these reasons two new analytical methods were developed in our laboratory which are less time-consuming, more effective and require smaller amounts of organic solvents. ***Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME)*** and ***Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop (DLLME – SFO)***.

Both analytical methods, ***DLLME*** and ***DLLME-SFO***, were developed for the determination of UV Filters, Polycyclic musks (PCMs) and phthalate esters (PAEs) in environmental water and soil samples and ***DLLME-SFO*** was applied in the Wastewater Treatment Plant Of Ioannina in order to retrace and determine the concentration of the analytes. ***DLLME*** method was coupled with GC-MS and HPLC instrumentation for the analysis of UV Filters, Polycyclic musks (PCMs) and phthalate esters (PAEs), on the other hand ***DLLME-SFO*** was combined with GC-MS.

A lot of parameters influence the extraction efficiency such as the volume of extraction and disperser solvent, salt effect and extraction time, of both methods. All the parameters were optimized with the aid of response surface methodology and experimental design. Firstly, a Plackett - Burman screening design was used to choose the significant variables for the optimization. Secondly, the significant factors were optimized by using a central composite design (CCD) and the quadratic model between the dependent and the independent variables was built. Finally, desirability function was used for simultaneous optimization of all affecting parameters in order to achieve the highest extraction efficiency.

Next step in our research was the contrast between the ***DLLME*** and ***DLLME-SFO*** analytical methods, with the aid of *F-test* and *t-test*. The results saw no significant difference. The main advantages of ***DLLME-SFO*** in comparison to ***DLLME*** are:

1. The use of lower toxicity extracting solvents
2. The floated extractant is solidified and easily collected from the top of the solution for analysis

For these reasons, ***DLLME-SFO*** method was selected for the development and the determination of all the compounds in environmental samples and then to applied in the Wastewater Treatment Plant Of Ioannina in order to retrace and determine the concentration of the analytes.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Μυπογιάννης Κ. Π. *Comite International D'Esthetique Et De Cosmetologie (CIDESCO)*, (2008).
- 2) OUMEISH Y., M.D., FRCP (GLASGOW), *Clinics in Dermatology* Y, (2001), 19, 375.
- 3) Angeloglou M. A, *History of make-up*. New York; Macmillan, (1971), 49.
- 4) Blanco D. F., *Plast Reconstructive Surgery* (2000), 105, 1196.
- 5) Malkey, J.P., Oehme, F.W., *Vet. Hum. Toxicol.*, (1993), 35, 445.
- 6) Shelley, W.B., Hurley, H., *Brit. J. Dermatol.*, (1958), 70, 75.
- 7) Kleinhans, D, Knoth, W., *Dermatologica*, (1976), 152, 161.
- 8) <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1976L0768:20070508:EN:PDF>
- 9) <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/cos-pol.html>
- 10) <http://www.fda.gov/opacom/laws/fdcact/fdctoc.htm>
- 11) http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees
- 12) Pauwels, M., Rogiers, V., *Toxicol. Lett.* (2004), 151, 7
- 13) Pauwels, M., Dejaegher, B., Heyden, Y.V., Rogiers, V., *Food Chem. Toxicol.*, (2009), 47, 898.
- 14) <http://www.cir-safety.org/>
- 15) Eschke H. D., *The Handbook of Environmental Chemistry*, Part X (2004), 3, 17.
- 16) Baur A, *Ber. Dtsch. Ges.*, (1891), 24, 28320.
- 17) Yamagishi T., Miyazaki T., Horii S., Kaneko S., *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, (1981), 26, 656.
- 18) Yamagishi T., Miyazaki T., Horii S., Akiyamak K., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, (1983), 12, 83.
- 19) Rimkus G., Wolf M., *Dtsch. Lebensm-Rundsch*, (1993), 89, 171.
- 20) Rimkus G., Wolf M., *Dtsch Lebensm-Rundsch* (1993), 89, 103.
- 21) Rebmann A., Wauschkuhn C., Waizenegger W., *Dtsch. Lebensm-Rundsch.*, (1997), 93, 251.

- 22) Ohloff, G., *Riechstoffe und Geruchssinn. In: Die Molekulare Welt der Du"fte*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, (1990), 195.
- 23) Kraft P., Frater G., *Chirality*, (2001), 13, 388.
- 24) Frater, G., Müller, U., Kraft, P., *Chim. Acta*, (1999), 82, 1656.
- 25) Personal communication A. Weber, SAEFL, based on data of the International Fragrance Association, IFRA.
- 26) Pietrogrande M. C., Basaglia G., *Trends in Analytical Chemistry*, (2007), 26, 11.
- 27) Berends W., *SEPAWA Dokumenta*, (1966), 1.
- 28) Lautenschlager S., Wulf H. C Pittelkow M. R., *Photoprotection* (2007), 370, 528.
- 29) Kullavanijaya P., MD, and Henry W. Lim, MD *Photoprotection J. AM. ACAD. DERMATOL.*, (2005), 52, 937.
- 30) XHMIKA XPONIKA, Ιούλιος 2009.
- 31) Di'az-Cruz M. S., Llorca M., Barcelo D., *Trends in Analytical Chemistry*, (2008), 27, 10.
- 32) Salvador A., Chisvert A., *Analytical Chimica Acta*, (2005), 537, 1.
- 33) Serodio P., Nogueira J.M.F., *WATER RESEARCH* (2006), 40, 2572.
- 34) www.wikipedia.org/wiki/phthalate
- 35) Ellington J.J., *J. Chem. Eng.* (2000), 44, 1414.
- 36) Cousins I.T., Mackay D. and Parkerton T.F., *The Handbook of Environmental Chemistry*, Part Q (2003), 3, 57.
- 37) Shelton D.R., Boyd S. A. Tidje J.M., *Envir. Sci. Technol.*, (1984), 18, 93.
- 38) Dragnat C., Teil M.J., Chevreuil M., Blanchard M., *The Science Of The Total Environment*, (2009), 407, 1235.
- 39) Aparicio I., Santos J. L., Alonso E., *Waste Management*, (2009), 29, 1747.
- 40) Chu W., Lau T.K., Graham N., *Chemosphere*, (2005), 60, 1045.
- 41) Cuderman P., Heath E., *Anal. Bioanal. Chem.*, (2007), 387, 1343.

- 42) Giokas D. L., Salvador A., Chisvert A., *Trends in Analytical Chemistry*, (2007), 26, 360.
- 43) Roslev P., Vorkamp K., Aarup J., Frederiksen K., Nielsen P. H., *WATER RESEARCH*, (2007), 41, 969.
- 44) Staples C.A., Peterson D.R., Parkerton T.F., Adams W.J., *Chemosphere*, (1997), 35, 667.
- 45) Gavala H.N., Alatrliste-Mondraggon F., Iranpour R. and Ahring B.K., *Chemosphere*, (2003), 52, 673.
- 46) Chang B.V., Yang C.M., Cheng C.H., Yuan S.Y., *Chemosphere*, (2004), 55, 533
- 47) Fang H.H.P., Liang D., Zhang T., *Bioresour. Technol.*, (2007), 98, 717.
- 48) Jianlong, W., Lujun, C., Hanchang, S., and Yi, Q., *Chemosphere*, (2000), 41, 1245.
- 49) Zeng X., Sheng G., Gui H., Chen D., Shao W., Fu J., *Chemosphere*, (2007), 69, 1305.
- 50) Berset J.D., Kupper T., Etter-Holzer R., Tarradellas J., *Chemosphere*, (2004), 57, 987.
- 51) Zhang X., Yao Y., Zeng X., Qian G., Guo Y., Wu M., Sheng G., Fu J., *Chemosphere*, (2008), 72, 1553.
- 52) Chen D., Zeng X., Sheng Y., Bi X., Gui H., Sheng G., Fu J., *Chemosphere*, (2007), 66, 252.
- 53) Stevens JL, Northcott GL, Stern GA, Tomy GT, Jones KC., *Environ Sci. Technol.*, (2003), 37, 462.
- 54) Yang JJ, Metcalfe CD, *Science of the total Environment*, (2006), 363, 149.
- 55) Kupper T, Berset JD, Etter-Holzer R, Furrer R, Tarradellas J., *Chemosphere*, (2004), 54, 1111.
- 56) Herren D., Berset JD., *Chemosphere*, (2000), 40, 565.
- 57) Heberer T., *Acta Hydrochim Hydrobiol*, (2002), 30, 227.
- 58) Zeng A., Sheng G., Xiong Y., Fu J., *Chemosphere*, (2005), 60, 817.

- 59) Horii Y., Reiner J.L., Loganathan B.G., Kumar K.S., Sajwan K., Kannan K., *Chemosphere*, (2007), 68, 2011.
- 60) Rodil R., Moeder M., Altenburger R., Schmitt-Jansen M., *Anal Bioanal Chem*, (2009), 395, 1513.
- 61) Rodil R., Schrader S., Moeder M., *Journal of Chromatography A*, (2009), 1216, 4887.
- 62) Balmer M.E., Buser H.R., Muller M.D., Poiger T., "Occurrence of the organic UV-filter compounds BP-3, 4-MBC, EHMC, and OC in wastewater, surface waters, and in fish from Swiss lakes", *Agroscope*, Final Report. March 2004.
- 63) Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R. M., Guwy A. J., *WATER RESEARCH*, (2009), 43, 363.
- 64) Plagellat C., Kupper T., Furrer R., Luiz Felipe de Alencastro, Dominique G., Tarradellas J., *Chemosphere*, (2006), 62, 915.
- 65) Nieto A., Borrull F., Marcia R. M., Pocurull E., *Journal of Chromatography A*, (2009), 1216, 5619.
- 66) Sánchez-Avila J., Bonet J., Velasco G., Lacorte S., *Science of the Total Environment*, (2009), 407, 4157.
- 67) Alberta Environment (1999b) "Data analysed for phthalates in surface water in Alberta." Water Sciences Branch, Water Data Management Section. Edmonton, AB.
- 68) Kristensen P, Torslov J, Samsoe-Peterson L, Rasmussen J.O., (1996) "Sludge and Waste Products to be used on Arable Land." MilJoProject No. 328. MilJo-09, Energiministeriet, Miljostyrelsen. Copenhagen, Denmark, 165 pp.
- 69) Fromme H., Kuchler T., Otto T, Pilz K., Muller J., Wenzel A., *WATER RESEARCH*, (2002), 36, 1429.
- 70) Buerge I.J., Buser H. R., Markus D. Poiger M., Poiger T., *Environ. Sci. Technol.*, (2003), 37, 5636.
- 71) Lv Y., Yuan T., Hu J., Wang W., *Analytical Sciences*, (2009), 25.
- 72) Peck A.M., Hornbuckle K.C., *Environ. Sci. Technol.*, (2004), 38, 367.

- 73) Winkler M., Headley J.V., Peru K.M., *Journal of Chromatography A*, (2000), 903, 203.
- 74) Dsikowitzky L., Schwarzbauer J., Littke R., *Organic Geochemistry*, (2002), 33, 1747.
- 75) Balmer M. E., Buser H. R., Muller M. D., Poiger T., *Environ. Sci. Technol.* (2005), 39, 953.
- 76) Poiger T., Buser H. R., Balmer M.E., Bergqvist P.A., Muller M. D., *Chemosphere*, (2004), 55, 951.
- 77) Rodil R., Quintana J.B., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D., *Anal. Chem.*, (2008), 80, 1307.
- 78) Negreira N., Rodríguez I., Ramil M., Rubv E., Cela R., *Analytica Chimica Acta*, (2009), 638, 36.
- 79) Rodil R., Quintana J.B., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D., *Journal of Chromatography A*, (2009), 1216, 2958.
- 80) Giokas D. L., Sakkas V. A., Albanis T. A., *J. Chromatogr. A*, (2004), 1026, 289.
- 81) Lambropoulou D.A., Giokas D.L., Sakkas V.A., Albanis T.A., Karayannis M.I., *J. Chromatogr. A*, (2002), 967, 243.
- 82) Luks-Betlej K., Popp P., Janoszka B., Paschke H., *Journal of Chromatography A*, (2001), 938, 93.
- 83) Casajuana N., Lacorte S., *Chromatographia*, (2003), 57.
- 84) Clark K., Cousins I. T., Mackay D., Yamada K., *The Handbook of Environmental Chemistry*, Part Q (2003), 3, 125.
- 85) Polo M., Llompart M., Garcia-Jares C., Cela R., *Journal of Chromatography A*, (2005), 1072, 63.
- 86) Barcelo D., *Trends in Analytical Chemistry*, (2004), 23.
- 87) Zeng X., Mai B., Sheng G., Luo X., Shao W., An T., Fu J., *Environmental Toxicology and Chemistry*, (2008), 27, 18.

- 88)Steffen D., "Niedersächsisches Landesamt für Ökologie, Hildesheim, Personal communication", (2000), Germany.
- 89)Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, (2001) Germany.
- 90)Wiegel S, Harms H, Stachel B, Reincke H., "Synthetische Moschus-Duftstoffe in der Elbe. Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe", (2000), Hamburg, Germany.
- 91)Fromme H., Otto T., Pils K., *WATER RESEARCH*, (2001), 35, 121.
- 92)Difrancesco A. M., Chiu P. C., Standley L. J., Allen H. R., Salvito D. T. *Environ. Sci. Technol.*, (2004), 38, 194.
- 93)R. Rodil, M. Moeder, *Anal. Chim. Acta*, (2008), 612 152.
- 94)Jeon H. K., Chungb Y., Ryu J. C., *Journal of Chromatography A*, (2006), 1131, 192.
- 95)Nakata H., Murata S., Shinohara R., Filatreau J., Isobe T., Takahashi S. Tanabe S., *Environmental Research in Asia*, (2009), 239.
- 96)Michael PR, Adams WJ, Werner AE, Hicks O., *Environ. Toxicol. Chem.*, (1984), 3, 377.
- 97)Durán-Alvarez J. C., Becerril-Bravo E., Castro V. S., Jimenez B., Gibson R., *Talanta*, (2009), 78, 1159.
- 98)Gibson R., Wang M. J., Padgett E., Beck A. J., *Chemosphere*, (2005), 61, 1336.
- 99)Yuan S.Y., Liu C., Liao C.S., Chang B.V., *Chemosphere*, (2002), 49 1295.
- 100) Zeng F., Cui K., Xie Z., Liu M., Li Y., Lin Y., Zeng Z., Li F., *Environment International*, (2008), 34, 372.
- 101) Rimkus G. G., *Toxicology Letters*, (1999), 111, 37.
- 102) Gatermann R., Hellou J., Hühnerfuss H., Rimkus G., Zitko V., *Chemosphere*, (1998), 38, 3431.
- 103) Rudel H., Bohmer, W., Schroter-Kermani, C., *Journal of Environmental Monitoring*, (2006), 8, 812.

- 104) Rimkus, G.G., *Meeting the International Council for the Exploration of the Sea (ICES)*, March 1997, Oostende, Belgium.
- 105) Buser H.R., Balmer M.E., Schmid P., Kohler M., *Environ. Sci. Technol.*, (2006), 40, 1427.
- 106) Muller S., Schmid P., Schlatter C., *Chemosphere*, (1996), 33, 17.
- 107) Rimkus G.G., Wolf M., *Chemosphere*, (1996), 33, 2033.
- 108) Kannan K., Reiner J.L., Yun S.H., Perrotta E.E., Tao L., Johnson-Restrepo B., Rodan B.D., *Chemosphere*, (2005), 61, 693.
- 109) Kuklenyik Z., Bryant X. A., Needham L. L., Calafat A. M., *Journal of Chromatography B*, (2007), 858, 177.
- 110) Wallner P., Moshhammer H., Hartl W., Sattelberger R., Lorbeer G., Kundi M., *Science of the Total Environment*, (2009), 407, 4821.
- 111) Schlumpf M., Cotton B., Conscience M., Haller V., Steinmann B., Lichtensteiger W., *Environmental Health Perspectives*, (2001), 109, 239.
- 112) Schreurs R.H., Lanser P., Seinen W., Van der Burg B., *Arch. Toxicol.* (2002), 76, 257.
- 113) Mueller S.O., Kling M., Firzani P.A., Mecky A., Duranti E., Shields-Botella J., Delansorne R., Borschard T., Kramer P.J., *Toxicol. Lett.*, (2003), 142, 89.
- 114) Hany J., Nagel R., *Nachweis von UV-Filtersubstanzen in Muttermilch. Deut. Lebensm.-Rundsch.*, (1995), 91, 341.
- 115) Felix T., Hall B.J., Brodbelt J.S., *Anal. Chim. Acta*, (1998), 371, 195.
- 116) Swan S.H., Main K.M., Liu F., Stewart S.L., Kruse R.L., Calafat A.M., Mao C.S., Redmon J.B., Ternand C.L., Sullivan S., et al., *Environmental Health Perspectives*, (2005), 113, 1056.
- 117) Takeuchi S., Iida M., Kobayashi S., Jin K., Matsuda T., Kojima H., *Toxicology*, (2005), 210, 223.
- 118) Andersen H.R., Andersson A.M., Arnold S.F., Autrup H., Barfoed M., Beresford N.A., Bjerregaard P., Christiansen L.B., Gissel B., Hummel R., Jørgensen E.B.,

Korsgaard B., Guevel R.L., Leffers H., McLachlan J., Møller A., Nielsen J.B., Olea N., Oles-Karasko A., Pakdel F., Pedersen K.L., Perez P., Skakkeboek N.E., Sonnenschein C., Soto A.M., Sumpter J.P., Thorpe S.M., Grandjean P., *Environmental Health Perspectives*, (1999), 107, 89.

119) Harris,C.A., Henttu P., Parker M.G., Sumpter J.P., *Environmental Health Perspectives*, (1997), 105, 802.

120) Jobling S., Reynolds T., White R., Parker M.G., Sumpter J.P., *Environmental Health Perspectives*, (1995), 103, 582.

121) Nishihara T., Nishikawa J., Kanayama T., Dakeyama F., Saito K., Imagawa M., Takatori S., Kitagawa Y., Hori S., Utsumi H., *J. Health Sci.* (2000), 46, 282.

122) Artola-Garicano E., Borkent I., Hermens J.L.M., Vaes W.H.J., *Environ Sci Technol*, (2003), 37, 3111.

123) Lee H.B., Peart T.E., Sarafin K., *Water Qual Res J Can*, (2003), 38, 683.

124) Kanda R., Griffin P., James H.A., Fothergill J., *J Environ Monitor*, (2003), 5, 823.

125) Stackelberg P.E., Furlong E.T., Meyer M.T., Zaugg S.D., Henderson A.K., Reissman D.B., *Sci Total Environ* , (2004), 329, 99

126) Kolpin D.W., Skopec M., Meyer M.T., Furlong E.T., Zaugg S.D., *Sci Total Environ*, (2004), 328, 119.

127) Osemwengie L.I., Gerstenberger S.L., *J Environ Monitor*, (2004) 6, 533.

128) Osemwengie L.I., Steinberg S., *J Chromatogr A*, (2001), 932, 107.

129) Garcia-Jares C., Llompart M., Polo M., Salgado C., Macias S., Cela R., *J Chromatogr A*, (2002), 963, 277.

130) Reiner J. L., Berset J. D., Kannan K., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, (2007), 52, 451.

131) Kupper T., Plagellat C., Brandli R.C., Alencastro L.F., Grandjean D., Tarradellas J., *WATER RESEARCH*, (2006), 40, 2603.

- 132) Simonich S.L., Begley W.M., Debaere G., Eckhoff W.S., *Environ. Sci. Technol.*, (2000), 34, 959.
- 133) Ternes T.A., Bonerz M., Herrmann N., Löffler D., Keller E., Lacida B.B., Alder A.C., *J Chromatogr A*, (2005), 1067, 213.
- 134) Bester K., Huhnerfuss H., Lange W., Rimkus G.G., Theobald N., *WATER RESEARCH*, (1998), 32, 1857.
- 135) Regueiro J., Llompart M., Garcia-Jaresa C., Garcia-Monteagudo J. C., Cela R., *Journal of Chromatography A*, (2008), 1190, 27.
- 136) Bester K., *J Environ Monitor*, (2005), 7, 43.
- 137) Bester K., *Chemosphere*, (2004), 57, 863.
- 138) Winkler M., Kopf G., Hauptvogel C., Neu T., *Chemosphere*, (1998), 37, 1139.
- 139) Burkhardt M. R., ReVello R. C., Smith S. G., Zaugg S. D., *Analytica Chimica Acta*, (2005), 534, 89.
- 140) Osemwengie L.I., Steinberg S., *Journal of Chromatography A*, (2003), 993, 1.
- 141) Draisci R., Marchiafava C., Ferretti E., Palleschi L., Catellani G., Anastasio A., *J Chromatogr A* (1998), 814, 187.
- 142) Kallenborn R., Gatermann R., Nygard T., Knutzen J., Schlabach M. *Fresen Environ Bull*, (2001), 10, 832.
- 143) Duedahl-Olesen L, Cederberg T, Pedersen KH, Hojgard A., *Chemosphere*, (2005), 61, 422.
- 144) Fromme H., Otto T., Pilz K., Neugebauer F., *Chemosphere*, (1999), 39, 1723.
- 145) Shek W.M., Murphy M.B., Lam J.C.W., Paul K.S. Lam, *Marine Pollution Bulletin*, (2008), 57, 373.
- 146) Tan B.L.L., Hawker D. W., Muller J. F., Tremblay L. A., Chapman H. F., *WATER RESEARCH*, (2008), 42, 404 .

- 147) Cai Q. Y., Mo C. H., Wu Q. T., Zeng Q. Y., Katsoyiannis A. *Chemosphere*, (2007), 68, 1751.
- 148) Liu H.C., Den W., Chan S.F., Kin K. T., *Journal of Chromatography A*, (2008), 1188, 286.
- 149) Zalieckaitė R., Adomavičiūtė E. and Vičkačkaitė V., *CHEMIJA*, (2007), 18, 25.
- 150) Cao X.L., *Journal of Chromatography A*, (2008), 1178, 231.
- 151) Huang P.C., Tien C.J., Sun Y.M., Hsieh C.Y., Lee C.C., *Chemosphere*, (2008), 73, 539.
- 152) Franke S., Meyer C., Heinzl N., Gattermann R., Hühnerfuss H., Rimkus G., König W.A, Franke W., *Chirality*, (1999), 11, 795.
- 153) G.G. Rimkus (Ed.), *Synthetic Musk Fragrances in the Environment, The Handbook of Environmental Chemistry, Anthropogenic Compounds*, vol. 3, Springer, Berlin, 2004.
- 154) Itrich NR, Simonich SL, Federle TW (1998) SETAC 19th Annual Meeting, 14–15 November 1998, Charlotte, NC, USA.
- 155) Federle TW, Langworthy DE, Itrich NR, Simonich SL (2000) *Third SETAC World Congress, Brighton, UK, 24–29 May 2000, Poster Presentation 4B/P003:170*.
- 156) Biselli S., «*Entwicklung einer analytischen Methode zum Nachweis von økotoxikologisch relevanten organischen Problemstoffen in Sedimenten und Biota unter besonderer Berücksichtigung von Irgarol, synthetischen Moschusduftstoffen und deren Transformationsprodukten.*» PhD thesis, (2001) University of Hamburg, Hamburg, Germany
- 157) Gattermann R., «*Verteilung,Anreicherung und Transformation nitroaromatischer und polycyclischer Moschusduftstoffe sowie weiterer N- und P-haltiger Problemstoffe in derUmwelt*», PhD thesis (1999),University of Hamburg, Shaker,Aachen.

- 158) Valdersnes S., Kallenborn R., Sydnés L.K., *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, (2006), 86, 461.
- 159) Novakova L., Vlckova H., *Analytica Chimica Acta*, (2009), 656, 8.
- 160) Pena-Pereira F., Lavilla I., Bendicho C., *Spectrochimica Acta*, (2009), 64, 1.
- 161) Liu H., Dasputa P.K., *Anal. Chem.*, (1996), 68, 1817.
- 162) Sarafraz-Yazdi A. and Amiri A., *Trends in Analytical Chemistry*, (2009).
- 163) Xu L., Basheer C., Lee H.K., *J. Chromatogr. A*, (2007), 1152, 184.
- 164) Theis A.L., Waldack A.J., Hansen S.M., Jeannot M.A., *Anal. Chem.*, (2001), 73, 5651.
- 165) Fiamegos Y.C., Stalikas C.D., *Anal. Chim. Acta*, (2007), 599, 76.
- 166) Ma M., Cantwell F.F., *Anal. Chem.*, (1999), 71, 388.
- 167) Liu W., Lee H.K., *Anal. Chem.*, (2000), 72, 4462.
- 168) Xia L., Hu B., Juany Z., Wu Y., Liang Y., *Anal. Chem.*, (2004), 76, 2910.
- 169) Pedersen-Bjergaard S., Rasmussen K.E., *Anal. Chem.*, (1999), 71, 2650.
- 170) Psillakis E., Kalogerakis N., *Trends Anal. Chem.*, (2003), 22, 565.
- 171) Rezaee M., Assadi Y., Milani Hosseini M.R., Aghaee E., Ahmadi F., Berijani S., *J. Chromatogr. A*, (2006), 1116, 1.
- 172) Berijani S., Assadi Y., Anbia M., Milani Hosseini M.R., Aghaee E., *J. Chromatogr. A*, (2006), 1123, 1.
- 173) Liang P., Xu J., Li Q., *Analytica Chimica Acta*, (2008), 609, 53.
- 174) Rezaee M., Yamini Y., Faraji M., *Journal of Chromatography A*, (2010), 1217, 2342.
- 175) Farina L., Boido E., Carrau F., Dellacassa E., *Journal of Chromatography A*, (2007), 1157, 46.
- 176) Wei G., Li Y., Wang X., *J. Sep. Sci.*, (2007), 30, 3262.
- 177) Kozani R. R., Assadi Y., Shemirani F., Hosseini M. M. R., Jamali M. R., *Talanta*, (2007), 72, 387.

- 178) Melwanki M. B., Chen W. S., Bai H. Y., Lin T. Y., Fuh M. R., *Talanta*, (2009), 78, 618.
- 179) Xiong C., Ruan J., Cai Y., Tang Y., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2009), 49, 572.
- 180) Nagaraju D., Huang S. D., *Journal of Chromatography A*, (2007), 1161, 89.
- 181) Li Y., Wei G., Hu J., Liu X., Zhao X., Wang X., *Analytica Chimica Acta*, (2008), 615, 96.
- 182) Zang X.H., Wu Q. H., Zhang M.Y., Xi G. H., Wang Z., *Chinese Journal Of Analytical Chemistry*, (2009), 37.
- 183) Lord H., Pawliszyn J., *J. Chromatogr. A*, (2000), 902, 17.
- 184) Melwanki M. B., Fuh M.R., *Journal of Chromatography A*, (2008), 1198.
- 185) Farahani H., Noruzi P., Dinarvand R., Ganjali M.R., *J. Chromatogr. A*, (2007), 1172, 105.
- 186) Sereshti H., Karimi M., Samadi S., *J. Chromatogr. A*, (2009), 1216, 198.
- 187) Ebrahimzadeh H., Yamini Y., Kamarei F., *Talanta*, (2009), 79, 1472.
- 188) Cortada C., Vidal L., Pastor R., Santiago N., Canals A., *Anal. Chim. Acta*, (2009), 649, 218.
- 189) Montes R., Rodriguez I., Rubi E., Cela R., *J. Chromatogr. A*, (2009), 1216, 205.
- 190) Xiong J., Hu B., *J. Chromatogr. A*, (2008), 1193, 7.
- 191) Chiang J.S., Huang S.D., *Talanta*, (2008), 75, 70.
- 192) Fattahi N., Assadi Y., Milani Hosseini M.R., Jahromi E.Z., *J. Chromatogr. A*, (2007), 1157, 23.
- 193) Zhao E., Zhao W., Han L., Jiang S., Zhou Z., *J. Chromatogr. A*, (2007), 1175, 137.
- 194) Kozani R.R., Assadi Y., Shemirani F., Milani Hosseini M.R., Jamali M.R., *Chromatographia*, (2007), 66, 81.

- 195) Garcia-Lopez M., Rodriguez I., Cela R., *J. Chromatogr. A*, (2007), 1166, 9.
- 196) Fattahi N., Samadi S., Assadi Y., Milani Hosseini M.R., *J. Chromatogr. A*, (2007), 1169, 63.
- 197) Rezaee F., Bidari A., Pajand Birjandi A., Milani Hosseini M.R., Assadi Y., *J. Hazard. Mater.*, (2008), 158, 621.
- 198) Zhao R.S., Diao C.P., Wang X., Jiang T., Yuan J.P., *Anal. Bioanal. Chem.*, (2008), 391, 2915.
- 199) Birjandi A. P., Bidari A., Rezaei F., Milani Hosseini M.R., Assadi Y., *J. Chromatogr. A*, (2008), 1193, 19.
- 200) Bidari A., Hemmatkhah P., Jafarvand S., Milani Hosseini M.R., Assadi Y., *Microchim. Acta*, (2008), 163, 243.
- 201) Sarafray-Yazdi A., Razavi N., Yazdinejad S. R., *Talanta*, (2008), 75, 1293.
- 202) Zang X., Wang J., Wang O., Wang M., Ma J., Xi G., Wang Z., *Anal. Bioanal. Chem.*, (2008), 392, 749.
- 203) Hong-Xue X., Li-Jun H., Xiu-Ling W., Lu F., Kui L., Mei-Mei W., Da-Wei M., *Chin. J. Anal. Chem.*, (2008), 36, 1543
- 204) Xiao-Huan Z., Chun W., Shu-Tao G., Xin Z., Zhi W., *Chin. J. Anal. Chem.*, (2008), 36, 765.
- 205) Hu J., Fu L., Zhao X., Liu X., Wang H., Wang X., Dai L., *Anal. Chim. Acta*, (2009), 640, 100.
- 206) Tsai W.C., Huang S.D., *J. Chromatogr. A*, (2009), 1216, 5171.
- 207) Zhao R.S., Diao C.P., Chen Q.F., Wang X., *J. Sep. Sci.*, (2009), 32, 1069.
- 208) Liu X., Li J., Zhao Z., Zhang W., Lin K., Huang C., Wang X., *J. Chromatogr. A*, (2009), 1216, 2220.
- 209) Moinfar S., Milani Hosseini M.R., *J. Hazard. Mater.*, (2009), 169, 907.
- 210) Pusvaskiene E., Januskevicius B., Prichodko A., Vickackaite V., *Chromatographia*, (2009), 69, 271.

- 211) Zhou X., Zang X.H., Wang D.Y., Cui P.L., Wang Z., *Chin. J. Anal. Chem.*, (2009), 37, 41.
- 212) Farhadi K., Maleki R., Mohammad Nezhad N., *J. Chin. Chem. Soc.*, (2009) 56, 575.
- 213) Montes R., Rodriguez I., Ramil M., Rubi E., Cela R., *J. Chromatogr. A*, (2009), 1216, 5459.
- 214) Farajzadeh M.A., Bahram M., Jonsson J.A., *Anal. Chim. Acta*, (2007), 591, 69.
- 215) Xia J., Xiang B., Zhang W., *Anal. Chim. Acta*, (2008), 625, 28.
- 216) Maleki R., Mohammad Nezhad N., Samadi N., Farhadi K., *Microchim. Acta*, (2009), 165, 97.
- 217) Guo J.H., Li X.H., Cao X.L., Li Y., Wang X.Z., Xu X.B., *J. Chromatogr. A*, (2009), 1216, 3038.
- 218) Chen H., Ying J., Chen H., Huang J., Liao L., *Chromatographia*, (2008), 68, 629.
- 219) Fan Y.C., Hu Z.L., Chen M.L., Tu C.S., Zhu Y., *Chin. Chem. Lett.*, (2008), 19 985.
- 220) Farhadi K., Farajzadeh M.A., Matin A.A., Hashemi P., *Cent. Eur. J. Chem.*, (2009), 7, 369.
- 221) Wang X., Fu L., Wei G., Hu J., Zhao X., Liu X., Li Y., *J. Sep. Sci.*, (2008), 31 2932.
- 222) Ling P., Xu J., Li Q., *Anal. Chim. Acta*, (2008), 609, 53.
- 223) Zhou Q.X., Xie G.H., Pang L., *Chin. Chem. Lett.*, (2008), 19, 89.
- 224) Li Y., Hu J., Liu X., Fu L., Zhang X., Wang X., *J. Sep. Sci.*, (2008), 31, 2371.
- 225) Wu Q., Zhou X., Li Y., Zang X., Wang C., Wang Z., *Anal. Bioanal. Chem.*, (2009), 393, 1755.
- 226) Farhadi K., Farajzadeh M.A., Matin A.A., *J. Sep. Sci.*, (2009), 32, 2442.

- 227) Wu Q., Li Y., Wang C., Liu Z., Zang X., Zhou X., Wang Z., *Anal. Chim. Acta*, (2009), 638, 139.
- 228) Chen H., Chen H., Ying J., Huang J., Liao L., *Anal. Chim. Acta*, (2009), 632, 80.
- 229) Daneshfar A., Khezeli T., Lotfi H.J., *J. Chromatogr. B*, (2009), 877, 456.
- 230) Fu L., Liu X., Hu J., Zhao X., Wang H., Wang X., *Anal. Chim. Acta*, (2009), 632, 289.
- 231) Zhao X., Fu L., Hu J., Li J., Wang H., Huang C., Wang X., *Chromatographia*, (2009), 69, 1.
- 232) Farajzadeh M.A., Vardast M.R., Bahram M., *Chromatographia*, (2009), 69, 409.
- 233) Rezaee M., Yamini Y., Shariati S., Esrafil A., Shamsipur M., *J. Chromatogr. A*, (2009), 1216, 1511.
- 234) Farhadi K., Matin A.A., Hashemi P., *Chromatographia*, (2009), 69, 45.
- 235) Xu H., Song D., Cui Y., Hu S., Yu Q.W., Feng Y.Q., *Chromatographia*, (2009), 70, 775.
- 236) Zhou Q., Pang L., Xie G., Xiao J., Bai H., *Anal. Sci.*, (2009), 25, 73.
- 237)
- 238) Li Y., Liu J.L., Wang X.L., Jian Y.H., Dong D.M., Li N., *Chem. J. Chin. Univ. Chin.*, (2008), 29, 2142.
- 239) Wu Q., Wang C., Liu Z., Wu C., Zeng X., Wen J., Wang Z., *J. Chromatogr. A*, (2009), 1216, 5504.
- 240) Huang K.J., Wei C.Y., Liu W.L., Xie W.Z., Zhang J.F., Wang W., *J. Chromatogr. A*, (2009), 1216, 6636.
- 241) Craz-Vera M., Lucena R., Cardenas S., Valcarcel M., *J. Chromatogr. A*, (2009), 1216, 6459.
- 242) Pena M.T., Casais M.C., Mejuto M.C., Cela R., *J. Chromatogr. A*, (2009), 1216, 6356.

- 243) Chou T.Y., Lin S.L., Fuh M.R., *Talanta*, (2009), 80, 493.
- 244) Ravelo-Perez L.M., Hernandez-Borges J., Asensio-Ramos M., Rodriguez-Delgado M.A., *J. Chromatogr. A*, (2009), 1216, 7336.
- 245) Zhou Q., Pang L., Xiao J., *J. Chromatogr. A*, (2009), 1216, 6680.
- 246) Shamsipur M., Ramezani M., *Talanta*, (2008), 75, 294.
- 247) Jahromi E.Z., Bidari A., Assadi Y., Milani Hosseini M.R., Jamali M.R., *Anal. Chim. Acta*, (2007), 585, 305.
- 248) Jiang H., Qin Y., Hu B., *Talanta*, (2008), 74, 1160.
- 249) Naseri M.T., Milani Hosseini M.R., Assadi Y., Kiani A., *Talanta*, (2008), 75, 56.
- 250) Farajzadeh M.A., Bahram M., Mehr B.G., Jönsson J.A., *Talanta*, (2008), 75, 832.
- 251) Naseri M.T., Hemmatkhah P., Milani Hosseini M.R., Assadi Y., *Anal. Chim. Acta*, (2008), 610, 135.
- 252) Shokoufi N., Shemirani F., Assadi Y., *Anal. Chim. Acta*, (2007), 597, 349.
- 253) Gharehbaghi M., Shemirani F., Baghdadi M., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, (2008), 88, 513.
- 254) Bidari A., Zeini Jahromi E., Assadi Y., Milani Hosseini M.R., *Microchem. J.* (2007), 87, 6.
- 255) Liang P., Sang H., *Anal. Biochem.*, (2008), 380, 21.
- 256) Mallah M.H., Shemirani F., Ghannadi Maragheh M., *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, (2008), 278, 97.
- 257) Rivas R.E., Lopez-Garcia I., Hernandez-Cordoba M., *Spectrochim. Acta*, (2009), 64, 329.
- 258) Liang P., Peng L., Yan P., *Microchim. Acta*, (2009), 166, 47.
- 259) Liang P., Zhao E., Li F., *Talanta*, (2009), 77, 1854.
- 260) Hemmatkhah P., Bidari A., Jafarvand S., Milani Hosseini M.R., Assadi Y., *Microchim. Acta*, (2009), 166, 69.

- 261) Anthemidis A.N., Ioannou K.I.G, *Talanta*, (2009), 79, 86.
- 262) Ahmadzadeh Koky T., Farhadi K., *J. Hazard. Mater.*, (2009), 169, 726.
- 263) Mallah M.H., Shemirani F., Maragheh M.G., *Environ. Sci. Technol.*, (2009), 43, 1947.
- 264) Ding Z.Q., Liu G.D., *Chin. J. Anal. Chem.*, (2009), 37, 119.
- 265) Moghimi A., *J. Chin. Chem. Soc.*, (2008), 55, 369.
- 266) Ghrehbaghi M., Shemirani F., Baghdadi M., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, (2008) 88, 513.
- 267) Baliza P.X., Teixeira L.S.G., Lemos V.A., *Microchem. J.*, (2009), 93, 220.
- 268) Rivas R.E., Lopez-Garcia I., Hernandez-Cordoba M., *Microchim. Acta* , (2009), 166, 355.
- 269) Mohammadi S.Z., Afzali D., Taher M.A., Baghelani Y.M., *Talanta*, (2009), 80, 875.
- 270) Leong M. I., Huang S. D., *Journal of Chromatography A*, (2008), 1211, 8.
- 271) Khalili-Zanjani M.R., Yamini Y., Shariati S., Jonsson J.A., *Anal. Chim. Acta*, (2007), 585, 286.
- 272) Khalili-Zanjani M.R., Yamini Y., Yazdanfar N., Shariati S., *Anal. Chim. Acta*, (2008), 606, 334.
- 273) Yamini Y., Rezaee M., Khanchi A., Faraji M., Saleh A., *J. Chromatogr. A*, (2010), 1217, 2358.
- 274) Leong M.I., Huang S. D. *Journal of Chromatography A*, (2009), 1216, 7645.
- 275) Xu H., Ding Z., Lv L., Song D., Feng Y.Q., *Analytica Chimica Acta*, (2009), 636, 28.
- 276) Rezaee M., Yamini Y., Khanchi A., Faraji M., Saleha A., *Journal of Hazardous Materials*, (2010), 178, 766.
- 277) Chu-Chi Chang, Shang-Da Huang, *Analytica Chimica Acta*, (2010), 662, 39.

- 278) Lili L., Xu H., Song D., Cui Y., Hu S., Zhang G., *Journal of Chromatography A*, (2010), 1217, 2365.
- 279) Liu Y., Zhao E., Zhu W., Gao H., Zhou Z., *Journal of Chromatography A*, (2009), 1216, 885.
- 280) Mateus N.M.M., Branco L.C., Lourenco N.M.T., Afonso C.A.M., *Green Chem.*, (2003), 5, 347.
- 281) Yang H.Z., Gu Y.L., Deng Y.Q., Shi F., *Chem. Commun.*, (2002), 3, 274.
- 282) Murty M.S.R., Rajasekhar K., Harikrishna V., Yadav J.S., *Heteroatom Chem.*, (2008), 19, 104.
- 283) Bica K., Gaertner P., *Org. Lett.*, (2006), 8, 733.
- 284) Deng F.Z., Guo D.F., *Fenxi Huaxue*, (2006), 34, 1451.
- 285) Qi D., Cui S.Y., Chen X.G., Hu Z.D., *J. Chromatogr. A*, (2004), 1059, 191.
- 286) Belding S.R., Rees N.V., Aldous L., Hardacre C., Compton R.G., *J. Phys. Chem. C*, (2008), 112, 1650.
- 287) He L., Luo X., Xie H., Wang C., Jiang X., Lu K., *Analytica Chimica Acta* , (2009), 655, 52.
- 288) Chemometrics, Statistics and Computer application in Analytical chemistry, Matthias Otto, 1999, WILEY-VCH.
- 289) Malinowski, ER. *Factor Analysis in Chemistry*, (1991), Second Edition, page 1.
- 290) Beebe, KR, Pell, RJ, and MB Seasholtz. *Chemometrics: A Practical Guide*, (1998), page 1.
- 291) Massart DL, *Data Handling in Science and Technology 20A: Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part A*, (1997).
- 292) Jurgen W. Einax, *Chemometrics in analytical chemistry*, , *Anal Bioanal Chem*, (2004), 380, 368.
- 293) Ενόργανη Ανάλυση, Χατζηιωαννου Θ.Π., Κουππαρη Μ.Α. Αθήνα 2003.

- 294) Βουλγαρόπουλος Α.Ν., Ζαχαριάδης Γ.Α., Στρατής Ι.Α., «Εισαγωγή στην ποσοτική και χημική ανάλυση», Θεσσαλονίκη 1999.
- 295) Wang J., Wan W., *International journal of hydrogen energy*, (2009), 34, 235.
- 296) Bezerra M.A., Santelli R.E., Oliveira E.P., Villar L.S., Escaleira L.A., *Talanta*, (2008), 76, 965.
- 297) «*Matthias otto chemometric, statistics and computer application in analytical chemistry*», WILEY-VCH, Toronto 1999.
- 298) Vanaja K., Shobha Rani R.H., *Clinical Research and Regulatory Affairs*, (2007), 24, 1.
- 299) Plackett R.L., Burman J.P., *Biometrika*, (1946), 33, 305.
- 300) He Y.-Q., Tan T.-W., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (2006), 43, 9.
- 301) Purama R. K., Goyal A., *Bioresource Technology*, (2008), 99, 7108.
- 302) Box G.E.P., Wilson K.B., *J. R. Stat. Soc. B*, (1951), 13, 1.
- 303) Hanrahan G., «*Environmental Chemometrics, Principles and Modern Application*», (2009).
- 304) Harrington E.C., «The desirability function», *Ind. Qual. Cont.*, (1965), 21, 494.
- 305) Derringer G., Suich R., *J. Qual. Technol.*, (1980), 12, 214.
- 306) Παπαδογιάννης Ι. και Σαμανίδου Β., «*Ενόργανη Ανάλυση*», Εκδόσεις Πήγασος Θεσσαλονίκη, (2001), σελ. 331.
- 307) Ro K.W., Choi J.B., Lee M.H., Kim J.W., *J. Chromatogr. A*, (1994), 688, 375.
- 308) Nagtegaal, M., Ternes, T., Baumann, W., Nagel, R., UVFilterssubstanzenin Wasser und Fischen. *Umweltwiss. Schadst.-Forsch.*, (1997), 9, 79.
- 309) Hany, J., Nagel, R., Nachweis von UV-Filtersubstanzen in Muttermilch. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, (1995), 91, 341.

- 310) Vidal L., Chisvert A., Canals A., Salvador A., *Journal of Chromatography A*, (2007), 1174, 95.
- 311) Amini M. Younesi H., Bahramifar N., *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, (2009), 337, 67.
- 312) Gomathi N., Neogi S., *Applied Surface Science*, (2009), 255, 7590.
- 313) Li X., Ouyang J., Xu Y., Chen M., Song X., Yong Q., Yu S. *Bioresource Technology*, (2009), 100, 3613.
- 314) Sakkas V.A., Calza P., Islam M. A., Medana C., Baiocchi C., Panagiotou K., Albanis T., *Applied Catalysis B: Environmental*, (2009), 90, 526.
- 315) Rice S. L., Mirta S., *Analytica Chimica Acta*, (2007), 589, 125.
- 316) Vidal L., Chisvert A., Canals A., Salvador A., *Talanta*, (2010), 81, 549.
- 317) Franke S., Hildebrandt S., Schwarzbauer J., Link M., Francke W., *Anal. Chem.*, (1995), 353, 39.
- 318) Boti V.I., Sakkas V.A., Albanis T.A., *Journal of Chromatography A*, , (2009), 1216, 1296.
- 319) Lau E. V., Gan S., and Ng H. K., *International Journal of Analytical Chemistry*, (2010), 9.
- 320) Fontana A. R., Lana N.B., Martinez L. D., Altaminaro J. C., *Talanta* , (2010), 82, 359.
- 321) Αἰβαζίδης Α., «Τεχνολογία και Διαχείριση Υγρών αποβλήτων», (τόμος Ι και ΙΙ), (2000), Πανεπιστημιακό Σύγγραμμα Τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης (Ξάνθη).
- 322) Αἰβαζίδης Α., «Ανάλυση αδυναμιών και προτάσεις για τη βελτιστοποίηση των μονάδων ενεργού ιλύος για αφαίρεση άνθρακα, αζώτου και φωσφόρου», (2003).
- 323) Kosma C. I., Lambropoulou D. A., Albanis T. A., *Journal of Hazardous Materials*, (2010), 179, 804.

- 324) Van De Steene J. C., Mortier K. A., Lambert W. E., *Journal of chromatography A*, (2006), 1123, 71.
- 325) Lia W., Ma Y., Guo C., Hu W., Liu K., Wang Y., Zhu T., *WATER RESEARCH*, (2007), 41, 3506.
- 326) Vethaak A. D., Lahr J., Schrap S. M., Belfroid A. C., Rijs G.B.J., Gerritsen A., De Boer J., Bulder A. S., Grinwis G. C.M., Kuiper R. V., Legler J., Murk T. A.J., Peijnenburg W., Verhaar H. J.M., De Voogt P. *Chemosphere*, (2005), 59, 511.
- 327) Buser H.R., Muller M.D., Balmer M.E., Poiger T., Buerge I.J., *Environ. Sci. Technol.*, (2005), 39, 3013.
- 328) Stamatis N., Hela D., Konstantinou I., *Journal of Hazardous Materials*, (2010), 175, 829.
- 329) Tan BLL, Hawker DW, Müller JF, Leush FDL, Tremblay LA, Chapman HF. *Chemosphere*, (2007), 69, 644.
- 330) Artola-Garicano E, Hermenes JLM, Vaes WHJ, *Water Res*, (2003), 37, 4377.
- 331) Smyth S. A., Lishman L., Alaei M., Kleywegt S., Svoboda L., Yang J.J., Lee H.B., Seto P., *Chemosphere*, (2007), 67, 267.
- 332) Llompart, M., Garcia-Jare, C., Salgado, C., Polo, M., Cela, R., *J. Chromatogr. A*, (2003), 999, 185.
- 333) OSPAR (Oslo and Paris Commissions) Commission. OSPAR Background Document On Musk Xylene and other Musks 2000 <http://www.ospar.org/eng/html/welcome.html>
- 334) Rodil R., Schrader S., Moeder M., *Journal of Chromatography A*, (2009), 1216, 8851.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΤΡΑΦΙΕΣ

- ✎ **ΠΠΠ** : Προϊόντα Προσωπικής Περιποίησης
- ✎ **SPF** : Δείκτη Ηλιακής Προστασίας
- ✎ **PCMs** : Polycyclic Musks (πολυκυκλικές musk)
- ✎ **PAEs** : Phthalate esters (Φθαλικοί εστέρες)
- ✎ **Φίλτρα UV** : Αντιηλιακοί Παράγοντες
- ✎ **HHCB** : Galaxolide
- ✎ **AHTN** : Tonalide
- ✎ **ADB** : Celestolide
- ✎ **AHMI** : Phantolide
- ✎ **ATII** : Traseolide
- ✎ **Eusolex 4360** : 2-hydroxyl-4-methoxybenzophenone
- ✎ **Eusolex 6300** : 3-(4-methylbenzylidene)-camphor
- ✎ **Eusolex 9020** : 1-(4-tert-butylphenyl)3-(4-methoxyphenyl)1,3-propanedione
- ✎ **OS** : Octylsalicylate
- ✎ **HMS** : Homosalate
- ✎ **OD-PABA** : octyl dimethyl para-aminobenzoate
- ✎ **DnOP** : di-n-octyl phthalate
- ✎ **BBP** : benzyl butyl phthalate
- ✎ **1-UD-OH** : 1-Εντεκανόλη
- ✎ **1-DD-OH** : 1-Δωδεκανόλη
- ✎ **2-DD-OH** : 2-Δωδεκανόλη
- ✎ **n-HD** : n-Εξαδεκάνιο
- ✎ **UV** : Ultraviolet, Υπεριώδης Ακτινοβολία
- ✎ **GC-MS** : Gas Chromatography-Mass Spectroscopy, Αέρια Χρωματογραφία
συζευγμένη με φασματογράφο μάζας
- ✎ **HPLC** : High Performance Liquid Chromatography, Υγρή Χρωματογραφία
Υψηλής Απόδοσης

- ✎ **TDS** : total dissolved solids, Ολικά Διαλυμένα Στερεά
- ✎ **TOC** : total organic carbon, Ολικός Οργανικός Άνθρακας
- ✎ **DLLME** : Dispersive Liquid–Liquid Microextraction, Υγρή Υγρή Μικρό Εκχύλιση Διασποράς
- ✎ **DLLME-SFO** : Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Based On Solidification Of Floating Organic Droplet Method, Υγρή Υγρή Μικρο-Εκχύλιση Διασποράς Βασισμένη Στην Στερεοποίηση Της Επιπλέουσας Οργανικής Σταγόνας
- ✎ **IL-DLLME** : Υγρή Υγρή Μικρο-Εκχύλιση Της Διασποράς Συνδυαζόμενη Με Ιοντικό Διαλύτη Υγρής Φύσεως
- ✎ **RTIL_s** : Room Temperature Ionic Liquids, Διαλύτες Ιοντικής Φύσεως
- ✎ **SDME** : Single-Drop Microextraction, Μικρο-Εκχύλιση Της Σταγόνας
- ✎ **HF-LPME** : Hollow Fibre Liquid-Phase Microextraction, Υγρής Φάσης Μικρο-Εκχύλιση Της Ίνας
- ✎ **LLLME** : Liquid–Liquid–Liquid Microextraction, Υγρή Υγρή Υγρή Μικρο-Εκχύλιση
- ✎ **CFME** : Continuous-Flow Microextraction, Συνεχούς Ροής Μικρο-Εκχύλιση
- ✎ **DI-SDME** : Direct Immersion Single-Drop Microextraction, Άμεση Μικρο-Εκχύλιση Της Σταγόνας
- ✎ **EF** : Συντελεστής Προσυγκέντρωσης
- ✎ **R%** : Ανάκτηση Της Μεθόδου
- ✎ **LOD₅** : Limits Of Detection, Όρια Ανίχνευσης
- ✎ **LOQ₅** : Limits Of Quantification, Όρια Ποσοτικοποίησης
- ✎ **RSD** : Σχετικές Τυπικές Αποκλίσεις
- ✎ **ANOVA** : Analysis Of Variance, Ανάλυση Διακύμανσης
- ✎ **CCD** : Central Composite Design, Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός
- ✎ **MEYA** : Μονάδες Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων
- ✎ **SS/TS MLSS** : Ολικά Αιωρούμενα Στερεά
- ✎ **COD** : Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο

✎ **BOD_5** : Βιοχημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο

✎ **VSS/TVS $MLVSS$** : Πτητικά Αιωρούμενα Στερεά

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

ΕΠΩΝΥΜΟ : Παναγιώτου
ΟΝΟΜΑ : Αικατερίνη
ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΕΡΑ : Νικόλαος
ΟΝΟΜΑ ΜΗΤΕΡΑΣ : Ελένη-Ιφιγένεια
ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ (ΙΔΙΟΤΗΤΑ) : Χημικός
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ : 29/6/1982
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ : Χαλκίδα Ευβοίας
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ : Έγγαμη
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ : Ρόδων 4, Έξω Παναγίτσα, Τ.Κ.: 34100, Χαλκίδα
ΤΗΛΕΦΩΝΟ ΟΙΚΙΑΣ : 2221084277
ΤΗΛΕΦΩΝΟ ΚΙΝΗΤΟ : 6936459404
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ : k.panagiotou.mail@gmail.com



ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΑ ΠΡΟΣΟΝΤΑ-ΣΠΟΥΔΕΣ

Φεβρουάριος 2008 Υποψήφια Διδάκτωρ (Ph.D.) του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Δεκέμβριος 2007 Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (M.Sc.) στη Βιοανόργανη Χημεία (τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων)
Τίτλος Μεταπτυχιακής Διατριβής:
“Αλληλεπίδραση Cu(II) και Ni(II) με τα πεπτίδια Ac-GYDVEK-NH₂ και Ac-LAHYNK-NH₂ μοντέλα των ιστονών H₁(70-75) και H₂B(80-85) αντίστοιχα”.

Απρίλιος 2005 Πτυχίο Χημείας (τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων)
Βαθμός Πτυχίου: “Λίαν Καλώς” (6.74)

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

1/9/2011 έως και σήμερα	Διδασκαλία σε φροντιστήριο μέσης εκπαίδευσης.
1/11/2007 έως 31/12/2007 (2 Μήνες)	<u>Σύμβαση</u> “Παροχή επικουρικού έργου στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (φοιτητικά εργαστήρια Οργανικής Χημείας)”.
1/4/2005 έως 31/12/2006 (21 Μήνες)	<u>Σύμβαση Ανάθεσης Έργου</u> Συμμετοχή στο πρόγραμμα 61/1882 (Πυθαγόρας III Υπ 3.) “Μελέτη του Μηχανισμού τοξικότητας και καρκινογένεσης που προκαλείται από μεταλλικά ιόντα”.

ΤΕΧΝΟΓΝΩΣΙΑ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΝ

(Εμπειρία που αποκτήθηκε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής και διδακτορικής μου διατριβής)

- ✓ Υγρή Χρωματογραφία Ανάστροφης Φάσης (Αναλυτική, Ημι-παρασκευαστική και Παρασκευαστική κλίμακα) (Analytical RP-HPLC, Semi-Preperative and Preperative RP-HPLC)
- ✓ Αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματογράφο Μάζας (GC-MS)
- ✓ Φασματοσκοπία NMR
- ✓ Ποτενσιομετρικές αναλυτικές μέθοδοι
- ✓ Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι ανάλυσης

ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά: Καλή γνώση (Επίπεδο Lower)

ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΣΕ Η/Υ (ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΓΝΩΣΗ)

Κάτοχος πιστοποιητικού ECDL (7 ενότητες)

ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΚΑΙ ΕΠΙΚΟΥΡΙΚΟ ΕΡΓΟ

1/9/2011 έως σήμερα	Διδασκαλία σε φροντιστήριο μέσης εκπαίδευσης.
2007-2008 (Χειμερινό εξάμηνο)	Επίβλεψη φοιτητών στα φοιτητικά εργαστήρια Οργανικής Χημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (παροχή επικουρικού διδακτικού έργου).

2006-2007

(Χειμερινό εξάμηνο)

Επίβλεψη φοιτητών στα φοιτητικά εργαστήρια Γενικής και Ανόργανης Χημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (παροχή επικουρικού διδακτικού έργου).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. **“Efficiency of TiO₂ photocatalytic degradation of HHCB (1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta[γ]-2-benzopyran) in natural aqueous solutions by nested experimental design and mechanism of degradation”.**
«P. Calza, V.A. Sakka, C. Medana, M. Azharul Islam, E. Raso, **K. Panagiotou** and T. Albanis, Applied Catalysis B: Environmental 99 (2010) 314-320».
2. **“Application of chemometric assisted dispersive liquid-liquid microextraction to the determination of personal care products in natural waters”.**
«**Aikaterini N. Panagiotou**, Vasilios A. Sakkas, Triantafyllos A. Albanis, Analytica Chimica Acta 649 (2009) 135-140».
3. **“TiO₂/H₂O₂ mediated photocatalytic transformation of UV filter 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC) in aqueous phase: Statistical optimization and photoproduct analysis”.**
«V.A. Sakkas, P. Calza, M. Azharul Islam, C. Medana, C. Baiocchi, **K. Panagiotou**, T. Albanis. Applied Catalysis B: Environmental 90 (2009) 526-534».
4. **“Cu(II) and Ni(II) interactions with the terminally blocked hexapeptide Ac-Leu-Ala-His-Tyr-Asn-Lys-amide, (LAHYNK) model of histone H2B (80-85)”.**
«**Katerina Panagiotou**, Maria Panagopoulou, Tilemachos Karavelas, Vassiliki Dokorou, Andrew Hagarman, Jonathan Soffer, Reinhard Schweitzer-Stenner, Gerasimos Malandrinos and Nick Hadjiliadis, Bioinorganic Chemistry and Applications, Volume 2008, Article ID 257038, 10 pages».

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and Application (IMA 2009)
2. Cest 2009-Chania, Grete, Crete
3. 54ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας
4. 5ο Συνέδριο Χημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Poster Presentations

1. **K. Panagiotou**, M. Panagopoulou, V. Dokorou, T. Karavelas, G. Malandrinos and N. Hadjiliadis, "Coordination properties of Cu(II) and Ni(II) ions towards histones model peptides", EUROBIC 8, Aveiro, Portugal, July 2-6, 2006.
2. **K. Panagiotou**, M. Panagopoulou, V. Dokorou, T. Karavelas, G. Malandrinos and N. Hadjiliadis, "Coordination properties of Cu(II) and Ni(II) ions towards histones model peptides", 9th Eurasia Conference, Antalya, Turkey, September 9-14, 2006.