



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων προσδιορισμού
πτητικών οργανικών ενώσεων, παραμενότων
οργανικών ρύπων και παραγώγων τους σε βιολογικά
υγρά.**

ΔΡΙΤΣΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2020

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων προσδιορισμού πτητικών οργανικών ενώσεων, παραμενόντων οργανικών ρύπων και παραγώγων τους σε βιολογικά υγρά.

ΔΡΙΤΣΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΑ

A.M.: 11701

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Μπακέας Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μπακέας Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Οικονόμου Αναστάσιος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Κόκκινος Χρήστος, Επικ. Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 08/10/2020

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης έγινε ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού των μεταβολιτών βενζολίου, τολουολίου, αιθυλοβενζολίου και ξυλολίου (BTEX) σε ορό αίματος με χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματογράφο μαζών.

Η προκατεργασία των δειγμάτων για την παραλαβή των μεταβολιτών BTEX περιλαμβάνει εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη σε υπέρηχους, συμπύκνωση σε περιστροφικό εξαμιστήρα και συμπύκνωση σε ρεύμα αζώτου τελικά. Εξαιτίας των πολικών ομάδων που βρίσκονται στις οξειδωμένες μορφές κρίνεται επιτακτική η ανάγκη παραγωγοποίησης. Τέλος, ακολουθεί αεριοχρωματογραφικός προσδιορισμός.

Η επικύρωση της μεθόδου έγινε μέσω εξέτασης χαρακτηριστικών ποιότητας όπως η ειδικότητα, η γραμμικότητα, η πιστότητα, οι ανακτήσεις και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Η μέθοδος παρουσιάζει ικανοποιητικά αποτελέσματα (ανακτήσεις από 82 έως 113%).

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Αναλυτική Χημεία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Υδροκινόνη, Κατεχόλη, Μανδελικό οξύ, Μουκονικό οξύ, Ιππουρικό οξύ, 2 – μεθυλ – ιππουρικό οξύ, 3 – μεθυλ – ιππουρικό οξύ, 4 – μεθυλ – ιππουρικό οξύ, BTEX, Μεταβολίτες, Αεριοχρωματογραφική Ανάλυση, Φασματομετρία Μάζας

ABSTRACT

The current thesis presents the development and validation of a method for the determination of metabolites of Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylene in blood serum, using gas chromatography mass spectrometry.

The samples pretreatment for the isolation of the secondary compounds involves extraction with dichloromethane / methanol via ultrasonic waves, concentration on a rotary evaporator and concentration in a nitrogen stream finally. Due to the polar groups in the oxidized forms, the need for derivatization is imperative. Finally, a gas chromatographic determination follows.

The validation of the method was performed through the examination of quality characteristics such as specificity, linearity, fidelity, recoveries and detection and quantification limits. The method represents satisfactory results (recoveries from 82 to 113%).

SUBJECT AREA: Analytical Chemistry

KEYWORDS: Hydroquinone, Catechol, Mandelic acid, Muconic acid, Hippuric acid, 2 – methyl – hippuric acid, 3 – methyl – hippuric acid, 4 – methyl – hippuric acid, BTEX, Metabolites, Gas - Chromatography, Mass Spectrometry

Αφιερώνεται στη μητέρα μου,

Αναστασία

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος ειδίκευσης με τίτλο «Αναλυτική Χημεία», υπό την επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή Αναλυτικής Χημείας, Ευάγγελου Μπακέα, ο οποίος διαμόρφωσε το αντικείμενο της εργασίας σύμφωνα με τα ειδικά μου ενδιαφέροντα.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ευάγγελο Μπακέα, για την καθοδήγηση και την συμπαράσταση που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας, καθώς και για την εμπιστοσύνη που επέδειξε στο πρόσωπό μου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους υποψήφιους διδάκτορες χημείας, Χρυσόχου Ειρήνη και Κανελλόπουλο Γιώργο για την αμέριστη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και να αφιερώσω αυτήν την εργασία στη μητέρα μου για την συμπαράσταση, την κατανόηση, την υπομονή και την πολύτιμη βοήθειά της. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω επίσης, για όλες τις θυσίες που έχει κάνει ώστε να μου παράσχει τη δυνατότητα να ασχοληθώ απερίσπαστη με τις σπουδές μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	13
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	15
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΙΚΗ ΡΥΠΑΝΣΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ.....	17
1.1 Ορισμός της ατμοσφαιρικής ρύπανσης.....	17
1.2 Πηγές ατμοσφαιρικών ρύπων.....	18
1.3 Κατηγορίες ατμοσφαιρικών ρύπων.....	20
1.3.1 Αέριοι ρύποι.....	20
1.3.2 Βαρέα μέταλλα.....	22
1.3.3 Παραμένοντες οργανικοί ρύποι (POPs).....	22
1.3.4 Αιωρούμενη σωματιδιακή ύλη.....	23
1.4 Επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία.....	24
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΒΕΝΖΟΛΙΟ, ΤΟΛΟΥΟΛΙΟ, ΑΙΘΥΛΟΒΕΝΖΟΛΙΟ, ΞΥΛΟΛΙΟ (ΒΤΕΧ) ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΤΟΥΣ.....	26
2.1 Βενζόλιο, Τολουόλιο, Αιθυλοβενζόλιο και Ξυλόλιο (ΒΤΕΧ).....	26
2.1.1 Πηγές και χρήσεις των ΒΤΕΧ.....	26
2.1.2 Επιπτώσεις των ΒΤΕΧ στην ανθρώπινη υγεία.....	29
2.2 Μεταβολίτες των ΒΤΕΧ.....	30
2.2.1 Υδροκινόνη.....	31
2.2.2 Κατεχόλη.....	33
2.2.3 Μουκονικό οξύ.....	35
2.2.4 Μανδελικό οξύ.....	37
2.2.5 Ιππουρικό οξύ και μεθυλ – ιππουρικό οξύ.....	39
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΚΑΙ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ.....	42

3.1 Εισαγωγή.....	42
3.2 Αέρια χρωματογραφία.....	42
3.3 Φασματοόμετρο μαζών.....	44
3.4 Σύζευξη αεριοχρωματογράφου και φασματομέτρου μαζών.....	46
4. ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ.....	48
4.1 Γενικές πληροφορίες.....	48
4.2 Ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs) ή ερυθροκύτταρα.....	49
4.3 Λευκά αιμοσφαίρια (WBCs) ή λευκοκύτταρα.....	51
4.4 Πλάσμα και ορός αίματος.....	52
5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	55
5.1 Αιμοληψία.....	55
5.2 Επεξεργασία δειγμάτων.....	55
5.3 Συντήρηση δειγμάτων.....	55
5.4 Παραγωγοποίηση.....	56
5.4.1 Αναγκαιότητα παραγωγοποίησης.....	56
5.4.2 Παραγωγοποίηση ενός σταδίου.....	57
5.4.3 Παραγωγοποίηση πολλαπλών σταδίων.....	57
5.4.4 Παραγωγοποίηση των μεταβολιτών ΒΤΕΧ.....	59
5.5 Εσωτερικό πρότυπο.....	62
5.6 Προσδιορισμός των μεταβολιτών ΒΤΕΧ.....	63
5.6.1 Γενικά.....	63
5.6.2 Οργανολογία.....	65
5.6.3 Αντιδραστήρια.....	66
5.6.4 Αρχή της μεθόδου.....	67
5.6.5 Σχολιασμός πορείας κατεργασίας.....	67
5.6.6 Αεριοχρωματογραφική ανάλυση.....	68
5.6.7 Διασφάλιση ποιότητας χημικών δοκιμών.....	70
5.6.7.1 Γενικά.....	70
5.6.7.2 Ειδικότητα και γραμμικότητα.....	70
5.6.7.3 Επαναληψιμότητα της μεθόδου.....	79
5.6.7.4 Αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου.....	81
5.6.7.5 Ορθότητα μεθόδου, όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.....	82

5.6.7.6	Σχολιασμός μεθόδου.....	84
5.7	Συμπεράσματα.....	85
6.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	86
	Βιβλιογραφία.....	87

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Ποσοστό συμμετοχής ανθρωπογενών πηγών ατμοσφαιρικής ρύπανσης	19
Σχήμα 2: Μοριακή Δομή των BTEX.....	27
Σχήμα 3: Παραγωγοποίηση ενός σταδίου με BSTFA.....	57
Σχήμα 4: Σχηματισμός παραγωγοποιημένης υδροκινόνης.....	59
Σχήμα 5: Καμπύλη βαθμονόμησης για την Υδροκινόνη (n=3).....	72
Σχήμα 6: Καμπύλη βαθμονόμησης για την Κατεχόλη (n=3).....	73
Σχήμα 7: Καμπύλη βαθμονόμησης για το Μανδελικό οξύ (n=3).....	74
Σχήμα 8: Καμπύλη βαθμονόμησης για το Μουκονικό οξύ (n=3).....	75
Σχήμα 9: Καμπύλη αναφοράς για το Ιππουρικό οξύ (n=3).....	76
Σχήμα 10: Καμπύλη αναφοράς για το 2 – Μεθυλ – ιππουρικό οξύ (n=3).....	77
Σχήμα 11: Καμπύλη αναφοράς για το 3 – Μεθυλ – ιππουρικό οξύ (n=3).....	78
Σχήμα 12: Καμπύλη αναφοράς για το 4 – Μεθυλ – ιππουρικό οξύ (n=3).....	79

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: : Πυραμίδα των επιπτώσεων της ατμοσφαιρικής ρύπανσης στην ανθρώπινη υγεία. ^[15]	25
Εικόνα 2: Παραγωγή ριζών υδροξυλίου παρουσία χαλκού και οξυγόνου που οδηγεί στην αποδόμηση του DNA. ^[22]	35
Εικόνα 3: : Φασματόμετρο μαζών. Σχηματική αναπαράσταση της εισαγωγής του δείγματος, της περιοχής ιονισμού, επιτάχυνση και διαχωρισμός των θραυσμάτων. ^[37]	45
Εικόνα 4: Απεικόνιση ερυθρών αιμοσφαιρίων ^[41]	50
Εικόνα 5: Απεικόνιση λευκού αιμοσφαιρίου ^[44]	51

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Μοριακή δομή μεταβολιτών ΒΤΕΧ.....	60
Πίνακας 2: Μοριακή δομή παραγωγοποιημένων μεταβολιτών ΒΤΕΧ.....	61
Πίνακας 3: Οι μελετώμενοι μεταβολίτες ΒΤΕΧ κατά σειρά έκλουσης.....	64
Πίνακας 4: Συνθήκες λειτουργίας αεριοχρωματογραφικού συστήματος για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών ΒΤΕΧ.....	69
Πίνακας 5: Λόγος αποκρίσεων (Σήμα αναλύτη/ Σήμα εσωτερικού προτύπου) προτύπων διαλυμάτων 5,7, 12,5, 25 και 50 ng/mL της Υδροκινόνης.....	71
Πίνακας 6: Λόγος αποκρίσεων (Σήμα αναλύτη/ Σήμα εσωτερικού προτύπου) προτύπων διαλυμάτων 5,7, 12,5, 25 και 50 ng/mL της Κατεχόλης.....	72
Πίνακας 7: Λόγος αποκρίσεων (Σήμα αναλύτη/ Σήμα εσωτερικού προτύπου) προτύπων διαλυμάτων 5,7, 12,5, 25 και 50 ng/mL του Μανδελικού Οξέος.....	73
Πίνακας 8: Λόγος αποκρίσεων (Σήμα αναλύτη/ Σήμα εσωτερικού προτύπου) προτύπων διαλυμάτων 5,7, 12,5, 25 και 50 ng/mL του Μουκονικού Οξέος.....	74
Πίνακας 9: Λόγος αποκρίσεων (Σήμα αναλύτη/ Σήμα εσωτερικού προτύπου) προτύπων διαλυμάτων 5,7, 12,5, 25 και 50 ng/mL του Ιππουρικού Οξέος.....	75
Πίνακας 10: Λόγος αποκρίσεων (Σήμα αναλύτη/ Σήμα εσωτερικού προτύπου) προτύπων διαλυμάτων 5,7, 12,5, 25 και 50 ng/mL του 2 – Μεθυλ – ιππουρικού Οξέος.....	76
Πίνακας 11: Λόγος αποκρίσεων (Σήμα αναλύτη/ Σήμα εσωτερικού προτύπου) προτύπων διαλυμάτων 5,7, 12,5, 25 και 50 ng/mL του 3 – Μεθυλ – ιππουρικού Οξέος.....	77
Πίνακας 12: Λόγος αποκρίσεων (Σήμα αναλύτη/ Σήμα εσωτερικού προτύπου) προτύπων διαλυμάτων 5,7, 12,5, 25 και 50 ng/mL του 4 – Μεθυλ – ιππουρικού Οξέος.....	78

Πίνακας 13: Μέση τιμή των χρόνων ανάσχεσης (t_R) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD(%)) του μίγματος των μεταβολιτών από τα πρότυπα διαλύματα 25 ng/mL (n=6).....	80
Πίνακας 14: Μέση τιμή των εμβαδών των κορυφών (Area) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD(%)) του μίγματος των μεταβολιτών από τα πρότυπα διαλύματα 5,7 και 50 ng/mL (n=6).....	80
Πίνακας 15: Μέση τιμή των χρόνων ανάσχεσης (t_R) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD(%)) των 8 μεταβολιτών των BTEX από τα πρότυπα διαλύματα από ημέρα σε ημέρα (n=6).....	81
Πίνακας 16: Μέση τιμή των εμβαδών των κορυφών (Area) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD(%)) του μίγματος των μεταβολιτών από τα πρότυπα διαλύματα 5,7 και 50 ng/mL από ημέρα σε ημέρα (n=6).....	82
Πίνακας 17: Εκατοστιαίο ποσοστό ανάκτησης των μεταβολιτών BTEX σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης. (αριθμός μετρήσεων n=6).....	83
Πίνακας 18: Όριο ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) για τους οκτώ υπό προσδιορισμό μεταβολίτες των BTEX.....	84

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΙΚΗ ΡΥΠΑΝΣΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ

1.1 Ορισμός της ατμοσφαιρικής ρύπανσης

Μετά τη βιομηχανική επανάσταση έχει παρατηρηθεί μεγάλη ανθρώπινη παρέμβαση στο φυσικό περιβάλλον, τόσο στα αστικά κέντρα όσο και στην ύπαιθρο, λόγω της τεχνολογικής εξέλιξης και της οικονομικής ανάπτυξης. Στις μεγάλες πόλεις συγκεντρώνεται ένας τεράστιος αριθμός ανθρώπων, σε μια πολύ μικρή όμως έκταση. Έτσι, οι δραστηριότητες των ανθρώπων αυτών αθροίζονται συνεχώς και φτάνουν σε τέτοιο σημείο που το φυσικό περιβάλλον δεν μπορεί να τις αντιμετωπίσει, με αποτέλεσμα την εμφάνιση οικολογικών προβλημάτων.^[1]

Συγκεκριμένα ατμοσφαιρική ρύπανση καλείται η παρουσία στην ατμόσφαιρα ρύπων, δηλαδή κάθε είδους ουσιών, θορύβου, ακτινοβολίας ή άλλων μορφών ενέργειας σε ποσότητα, συγκέντρωση ή διάρκεια που μπορούν να προκαλέσουν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία, στους ζωντανούς οργανισμούς και στα οικοσυστήματα βραχυπρόθεσμα ή μακροπρόθεσμα.

Η ατμοσφαιρική ρύπανση βλάπτει την υγεία του ανθρώπου και το περιβάλλον. Στην Ευρώπη, οι εκπομπές πολλών ατμοσφαιρικών ρύπων έχουν μειωθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες με αποτέλεσμα τη βελτίωση της ποιότητας της ατμόσφαιρας στην περιοχή. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις ατμοσφαιρικών ρύπων παραμένουν σε υπερβολικά υψηλό επίπεδο και τα προβλήματα ποιότητας του αέρα εξακολουθούν να υπάρχουν. Σημαντικό ποσοστό του ευρωπαϊκού πληθυσμού κατοικεί σε περιοχές, ιδιαίτερα σε πόλεις, όπου παρουσιάζονται υπερβάσεις στα πρότυπα ποιότητας του αέρα: το όζον, το διοξείδιο του αζώτου και τα αιωρούμενα σωματίδια (ΑΣ) ενέχουν σοβαρούς κινδύνους για την υγεία. Πολλές χώρες έχουν υπερβεί ένα ή περισσότερα από τα όρια εκπομπών του 2010 για τέσσερις σημαντικούς ατμοσφαιρικούς ρύπους. Ως εκ τούτου, το θέμα της ατμοσφαιρικής ρύπανσης παραμένει σημαντικό.

Η ατμοσφαιρική ρύπανση είναι ένα τοπικό πρόβλημα όλης της Ευρώπης και του βόρειου ημισφαιρίου. Οι ατμοσφαιρικοί ρύποι που εκλύονται σε μία χώρα

ενδέχεται να μεταφερθούν στην ατμόσφαιρα και να επιδεινώσουν ή να καταστήσουν κακή την ποιότητα του αέρα σε μια άλλη περιοχή.

Τα αιωρούμενα σωματίδια, το διοξείδιο του αζώτου και το τροποσφαιρικό όζον αναγνωρίζονται πλέον κατά κανόνα ως οι τρεις σημαντικότεροι ρύποι από την άποψη των επιπτώσεων για την υγεία. Η μακροχρόνια και οξεία έκθεση σε αυτούς τους ρύπους ενδέχεται να προκαλέσει επιπτώσεις κυμαινόμενης βαρύτητας για την υγεία, από προσβολή του αναπνευστικού συστήματος έως πρόωρο θάνατο. Περίπου 90% του ευρωπαϊκού αστικού πληθυσμού εκτίθεται σε συγκεντρώσεις ρύπων που υπερβαίνουν τα όρια ποιότητας του αέρα τα οποία κρίνονται επιβλαβή για την ανθρώπινη υγεία. Παραδείγματος χάριν, τα λεπτόκοκκα αιωρούμενα σωματίδια (ΑΣ2.5) στον αέρα έχει υπολογισθεί ότι μειώνουν το προσδόκιμο ζωής στην ΕΕ κατά περισσότερο από οχτώ μήνες. Το βενζο-α-πυρένιο είναι καρκινογόνος ρύπος που προκαλεί ολοένα και μεγαλύτερη ανησυχία και, σε ορισμένες αστικές περιοχές, ιδιαίτερα της και κεντρικής και νότιας Ευρώπης, βρίσκεται σε συγκεντρώσεις πάνω από το όριο που έχει τεθεί για την προστασία της ανθρώπινης υγείας.^[2]

1.2 Πηγές ατμοσφαιρικών ρύπων

Στη ρύπανση της ατμόσφαιρας εμπλέκονται τόσο οι ανθρώπινες δραστηριότητες όσο και οι φυσικές διεργασίες και έτσι ένας ρύπος μπορεί να έχει ανθρωπογενείς ή φυσικές πηγές. Αν και τα προγράμματα ελέγχου εστιάζονται στην ανθρωπογενή ρύπανση και η φύση μπορεί να παράγει ρύπους. Εκτός από τις εκρήξεις των ηφαιστείων και τις φωτιές των δασών που μπορεί να επιβαρύνουν ιδιαίτερα το περιβάλλον, φυσική ρύπανση μπορεί επίσης να προέλθει από την αποσύνθεση φυτών και ζώων, τη διάβρωση του εδάφους, τους σπόρους γύρης και μυκήτων, τους πτητικούς υδρογονάνθρακες που εκλύονται από τα φυτά κ.α..

Οι σημαντικότερες φυσικές πηγές είναι: ^[3]

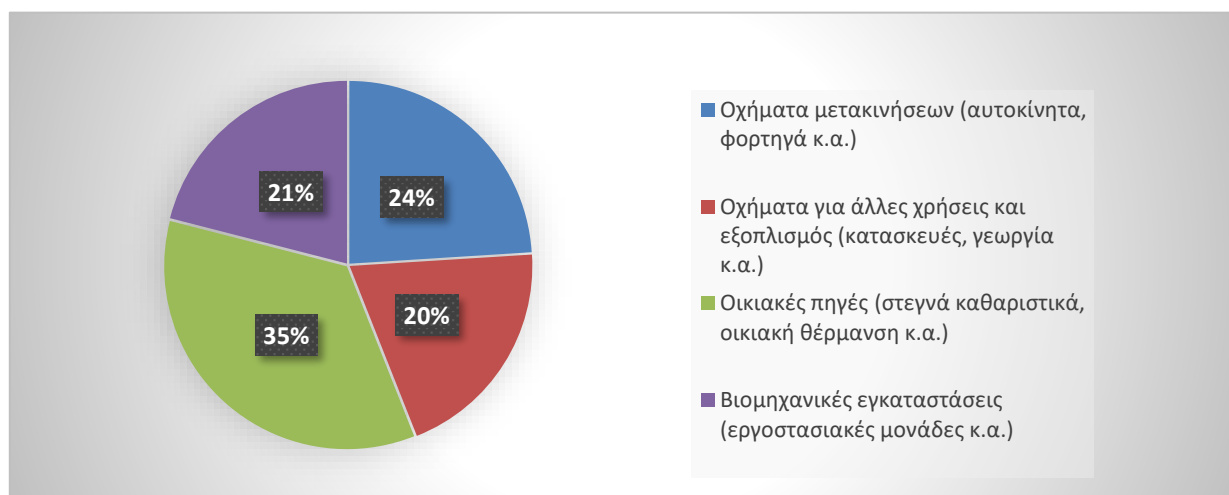
- i. Τα ηφαιστεια (κυρίως αιωρούμενα σωματίδια, διοξείδιο του θείου, υδρόθειο και μεθάνιο),

- ii. Οι πυρκαγιές δασών (κυρίως αιωρούμενα σωματίδια, μονοξειδίο και διοξείδιο του άνθρακα),
- iii. Οι ωκεανοί και γενικότερα οι θαλάσσιες εκτάσεις (κυρίως χλωριούχο νάτριο και θειικά άλατα),
- iv. Η βιολογική αποσύνθεση των φυτών και των ζώων (κυρίως υδρογονάνθρακες, αμμωνία και υδρόθειο),
- v. Η αποσάθρωση του εδάφους (αιωρούμενα σωματίδια) και
- vi. Τα φυτά και τα δέντρα (κυρίως υδρογονάνθρακες)

Οι ανθρωπογενείς εκπομπές ρύπων είναι αυτές που ευθύνονται κυρίως για τα περιβαλλοντικά προβλήματα που εμφανίστηκαν, καθώς υπάρχει μεγάλη πυκνότητα εκπομπών συγκεντρωμένη σε μικρές γεωγραφικές περιοχές, με αποτέλεσμα να ανατρέπεται η φυσική ισορροπία.

Ως κύριες πηγές ανθρωπογενούς ατμοσφαιρικής ρύπανσης μπορούμε να θεωρήσουμε:^[3]

- i. Τα μέσα μεταφοράς,
- ii. Την οικιακή θέρμανση,
- iii. Τις διεργασίες παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας,
- iv. Τις ανεπιθύμητες καύσεις και
- v. Τις βιομηχανικές καύσεις καυσίμων και γενικότερα τις υπόλοιπες βιομηχανικές εκπομπές.



Σχήμα 1: Ποσοστό συμμετοχής ανθρωπογενών πηγών ατμοσφαιρικής ρύπανσης

1.3 Κατηγορίες ατμοσφαιρικών ρύπων

Με βάση τον τρόπο που δημιουργούνται οι ατμοσφαιρικοί ρύποι, μπορούν να διακριθούν στις παρακάτω κατηγορίες:

- Πρωτογενείς που εκπέμπονται κατευθείαν από την πηγή στην ατμόσφαιρα. Π.χ. Διοξείδιο του άνθρακα (SO_2) και διοξείδιο του αζώτου (NO_2).
- Δευτερογενείς που δημιουργούνται στην ατμόσφαιρα λόγω των αντιδράσεων των πρωτογενών εκπομπών. Τέτοιοι είναι το όζον (O_3) και το θειικό ανιόν (SO_4^{2-}). Ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, τις επικρατούσες τοπικές και περιφερειακές μετεωρολογικές συνθήκες, οι πρωτογενείς ρύποι εναποτίθενται σε γειτονικές περιοχές από την πηγή ή μεταναστεύουν μερικά ή ακόμα και χιλιάδες χιλιόμετρα μακριά, με αποτέλεσμα τη μετατροπή τους σε δευτερογενείς.^[4]

Ανάλογα με τη φυσική τους κατάσταση οι ρύποι διακρίνονται:^[3]

- Αέριοι: SO_x , CO , NO_x , O_3 , υδρογονάνθρακες.
- Σωματιδιακοί (στερεοί ή υγροί): αυτοί σύμφωνα με το μέγεθος, το σχήμα, τη διεισδυτικότητά τους στον οργανισμό και τη χημική τους σύσταση ομαδοποιούνται σε επιμέρους κατηγορίες.

1.3.1 Αέριοι ρύποι

Οι κυριότεροι αέριοι ρύποι είναι τα οξείδια του αζώτου (NO_x), τα οξείδια του θείου (SO_x), το μονοξείδιο του άνθρακα (CO), το όζον (O_3) και οι πτητικές οργανικές ενώσεις (Volatile Organic Compounds, VOCs)

Όταν αναφερόμαστε στα οξείδια του αζώτου συνήθως εννοούμε το μονοξείδιο (NO) και το διοξείδιο του αζώτου (NO_2). Το μονοξείδιο του αζώτου είναι αέριο άχρωμο, τόσο φυσικής όσο και ανθρωπογενούς προέλευσης και οξειδώνεται παρουσία οξυγόνου σε διοξείδιο του αζώτου. Οι κυριότερες ανθρώπινες πηγές είναι οι κινητές και σταθερές πηγές καύσης. Υψηλά επίπεδα NO_2

μπορεί να επιδεινώσουν το άσθμα ή άλλες ασθένειες του αναπνευστικού, ενώ μακροχρόνια έκθεση είναι πιθανό να οδηγήσει στην πρόκλησή τους.

Το όζον, στη στρατόσφαιρα, θεωρείται ευεργετικό για τον άνθρωπο και το περιβάλλον καθώς απορροφά το μεγαλύτερο μέρος του υπεριώδους τμήματος της ηλιακής ακτινοβολίας. Αντίθετα, στην τροπόσφαιρα φυσιολογικά δεν υπάρχει. Δημιουργείται όμως σαν αποτέλεσμα των πολύπλοκων χημικών μετασχηματισμών πρωτογενών ρύπων όπως τα οξειδία του αζώτου, τα καυσαέρια των αυτοκινήτων και της βιομηχανίας, αλλά και τις πτητικές οργανικές ενώσεις που μέσω φωτοχημικών αντιδράσεων με το οξυγόνο παράγουν όζον (O_3). Η έκθεση στο όζον προκαλεί στους ανθρώπους δύσπνοια, φλεγμονές στο αναπνευστικό σύστημα, καθώς και επιδείνωση των αναπνευστικών ασθενειών.

Το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) από την άλλη, είναι προϊόν ατελούς καύσης και παράγεται από φυσικές πηγές και από τις ανθρώπινες δραστηριότητες. Κύρια φυσική πηγή του είναι οι πυρκαγιές και οι εκρήξεις ηφαιστείων ενώ οι ανθρώπινες δραστηριότητες που απελευθερώνουν μονοξείδιο του άνθρακα είναι η καύση βενζίνης από τα οχήματα. Στον άνθρωπο κύρια πηγή αποτελεί το κάπνισμα.

Τα οξειδία του θείου SO_x βρίσκονται σε αέρια μορφή και σ' αυτά περιλαμβάνονται το διοξείδιο (SO_2) και το τριοξείδιο του θείου (SO_3). Το διοξείδιο του θείου αποτελεί το 97-99% των εκπεμπόμενων οξειδίων του θείου στην ατμόσφαιρα. Προέρχεται κυρίως από την καύση στερεών και υγρών καυσίμων, ενώ μικρότερη αλλά σημαντική είναι η συνεισφορά από άλλες βιομηχανικές δραστηριότητες όπως η τήξη μετάλλων και η παραγωγή H_2SO_4 .

Τέλος, ο πιο χαρακτηριστικός εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής είναι οι πτητικές οργανικές ενώσεις. Αποτελούν πολυμελή οικογένεια χημικών ενώσεων με βάση το υδρογόνο και τον άνθρακα. Βρίσκονται κυρίως στο πετρέλαιο, το φυσικό αέριο και τον λιθάνθρακα. Ως ατμοσφαιρικοί ρύποι, προέρχονται απ' όλες σχεδόν τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες αλλά και από αρκετές φυσικές πηγές. Στην ατμόσφαιρα, οι πτητικές οργανικές ενώσεις βρίσκονται συνήθως και στις τρεις φυσικές καταστάσεις (αέρια, υγρή, στερεή) γεγονός που μαζί με την ανομοιογένεια στη χημική τους σύσταση, καθιστά

δύσκολο τον ποιοτικό και ποσοτικό τους προσδιορισμό. Κύριες πηγές εκπομπής τους είναι οι διεργασίες καύσης για την παραγωγή ενέργειας και την κυκλοφορία οχημάτων.^{[3],[5],[6]}

1.3.2 Βαρέα μέταλλα

Τα βαρέα μέταλλα μπορούν να οριστούν ποικιλοτρόπως ανάλογα με τις διαφορετικές τους ιδιότητες, όπως ο ατομικός αριθμός, το ατομικό βάρος, η τοξικότητα και η πυκνότητά τους. Γενικά πρόκειται για μέταλλα με ειδικό βάρος μεγαλύτερο των $5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Μερικά από αυτά είναι ωφέλιμα, αλλά τα περισσότερα εμφανίζουν τοξική δράση ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις. Τα κυριότερα μέταλλα από την άποψη της περιβαλλοντικής έρευνας με βάση την τοξικότητα ή τη βιολογική σημασία τους είναι ο μόλυβδος (Pb), ο υδράργυρος (Hg), το κάδμιο (Cd), ο άργυρος (Ag), το νικέλιο (Ni), το αρσενικό (As), το χρώμιο (Cr) και ο ψευδάργυρος (Zn).

Μεταφέρονται από τόπο σε τόπο μέσω του αέρα συνήθως ως συστατικά προσροφημένα πάνω σε αιωρούμενη σωματιδιακή ύλη. Ένα μέρος από αυτά καταλήγει μέσω της τροφικής αλυσίδας στον άνθρωπο προκαλώντας χρόνιες ή οξείες βλάβες. Η τοξική δράση των βαρέων μετάλλων παρουσιάζεται όταν εμπλέκονται στις βιοχημικές αντιδράσεις του οργανισμού. Οι τυπικές αποκρίσεις περιλαμβάνουν αναστολή της ανάπτυξης, καταστολή της κατανάλωσης οξυγόνου αλλά και βλάβη στην παραγωγή και την επούλωση ιστών. Ιδιαίτερα βαρέα μέταλλα όπως Pb, Cd και Hg έχουν προσελκύσει έντονα το ενδιαφέρον των μελετητών λόγω της μεγάλης αντοχής τους και της βιοσυσσωρευσιμότητας που παρουσιάζουν.^{[7],[8],[9]}

1.3.3 Παραμένοντες οργανικοί ρύποι (POPs)

Οι Παραμένοντες Οργανικοί Ρύποι (Persistent Organic Pollutants) είναι οργανικές ενώσεις, οι οποίες είναι ανθεκτικές στη χημική, βιολογική και φωτολυτική αποικοδόμηση. Κατά συνέπεια παρουσιάζουν μεγάλο χρόνο παραμονής στο έδαφος, σε ιζήματα αλλά και στους ζωντανούς οργανισμούς.

Οι απόψεις σχετικά με το πόσος πρέπει να είναι ο χρόνος ημιζωής για να χαρακτηριστεί ένας ρύπος POP φαίνεται να δίστανται. Στην πράξη πάντως, οι POPs βλέπουμε ότι στο έδαφος ή σε ιζήματα έχουν χρόνο ημιζωής που κυμαίνεται από χρόνια έως δεκαετίες ενώ στην ατμόσφαιρα αρκετές μέρες.

Οι παραμένοντες οργανικοί ρύποι παρουσιάζουν λιποφιλική συμπεριφορά γι' αυτό και συσσωρεύονται στους λιπώδεις ιστούς των ζώντων οργανισμών. Ο μεταβολισμός τους γίνεται εξαιρετικά αργά και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να περνάνε στην τροφική αλυσίδα. Μια ακόμα σημαντική ιδιότητα των POPs είναι η τάση τους να μεταφέρονται στην αέρια φάση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η μεγάλη κινητικότητα των POPs οφείλεται στη σχετικά μεγάλη πτητικότητα τους και είτε προσροφημένοι σε σωματίδια, είτε με τη μορφή ατμών μεταφέρονται με τα αέρια ρεύματα μέχρι να απομακρυνθούν μέσω των μηχανισμών υγρής και ξηρής απόθεσης. Σε αυτό συμβάλλει και η αντοχή τους σε αντιδράσεις αποικοδόμησης που λαμβάνουν χώρα στον αέρα.

Οι POPs χαρακτηρίζονται και από πολύ υψηλή τοξικότητα έχοντας μεταξύ άλλων καρκινογόνο δράση καθώς και τη δυνατότητα πρόκλησης διαταραχών στο ενδοκρινικό σύστημα των ζώντων οργανισμών. Ο όρος POPs περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό οργανικών ενώσεων που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες. Σε αυτούς ανήκουν τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBS), τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα (OCPS), τα εξαχλωροκυκλοεξάνια (HCBS), οι διοξίνες (PCDDS) και τα φουράνια (PCDFS) και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHS). Οι τρεις πρώτες κατηγορίες περιλαμβάνουν συνθετικά παρασκευασμένες οργανικές ενώσεις, με πλήθος βιομηχανικών, εμπορικών και γεωργικών εφαρμογών. Αντίθετα, οι δύο τελευταίες κατηγορίες δεν παρασκευάζονται εμπορικά, ούτε έχουν απ' ευθείας χρήση, αλλά αποτελούν ανεπιθύμητα προϊόντα της ατελούς καύσης ή πυρόλυσης άλλων οργανικών ενώσεων.^{[10],[11]}

1.3.4 Αιωρούμενη σωματιδιακή ύλη

Είναι ένας γενικός όρος που χρησιμοποιείται για μία κατηγορία ρύπων που αποτελούνται από ένα πολύπλοκο μίγμα σωματιδίων που αιωρείται στον

εισπνεόμενο αέρα. Τα σωματίδια αυτά διαφέρουν ως προς το μέγεθος και τη σύστασή τους ενώ παράγονται από πληθώρα φυσικών και ανθρωπογενών δραστηριοτήτων. Κύριες πηγές αιωρούμενων σωματιδίων είναι τα εργοστάσια, τα οχήματα, οι κατασκευές καθώς και οι πυρκαγιές, η ηφαιστειακή δραστηριότητα και οι στρόβιλοι αέρα. Το μέγεθος των αιωρούμενων σωματιδίων ποικίλλει και κατηγοριοποιείται ανάλογα με τη διάμετρο σε PM_{2.5} και PM₁₀ με αεροδυναμική διάμετρο μικρότερη από 2,5 και 10 μm αντίστοιχα. Άλλες κατηγοριοποιήσεις αφορούν στα υπέρλεπτα (0,1μm<), στα λεπτόκοκκα (1μm<) και στα χονδρόκοκκα (>1μm). Ανάλογα με το μέγεθός τους τα αιωρούμενα σωματίδια αποτίθενται σε διαφορετικό σημείο του αναπνευστικού συστήματος. Συγκεκριμένα τα PM₁₀ αποτίθενται στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα ενώ τα λεπτά και υπέρλεπτα σωματίδια εισχωρούν στο κατώτερο αναπνευστικό, ακόμα και στις κυψελίδες των πνευμόνων. Εκτός από το μέγεθος, σημαντικό ρόλο παίζει και η χημική σύσταση των αιωρούμενων σωματιδίων καθώς πληθώρα βαρέων μετάλλων, ιόντων και οργανικών ενώσεων βρίσκονται συζευγμένες στην αιωρούμενη σωματιδιακή ύλη. Χαρακτηριστικές οργανικές ενώσεις στα αιωρούμενα σωματίδια είναι και οι παραμένοντες οργανικοί ρύποι που έχουν ήδη αναφερθεί.^[12]

1.4 Επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία

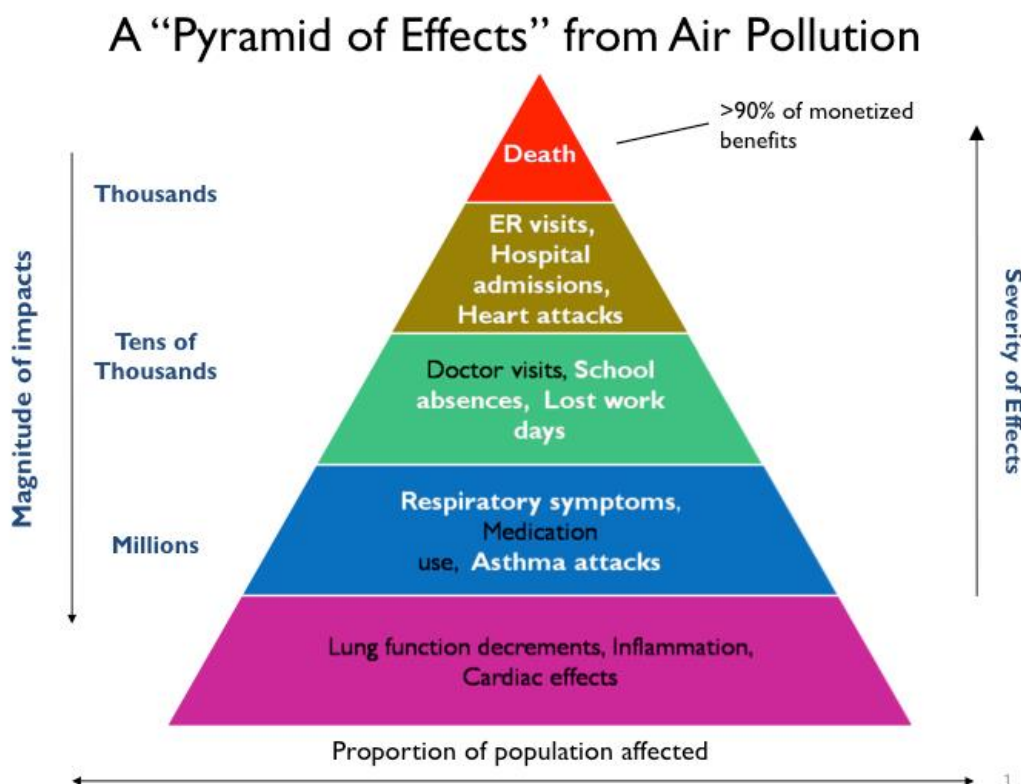
Στο αστικό περιβάλλον των ανεπτυγμένων και των αναπτυσσόμενων χωρών, η ατμοσφαιρική ρύπανση επηρεάζει σημαντικά τη ζωή των ανθρώπων. Σύμφωνα με πρόσφατες δημοσιεύσεις τουλάχιστον 1,5 εκατομμύριο άνθρωποι εκτίθενται σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις αερίων ρύπων όπως η αιωρούμενη σωματιδιακή ύλη, το διοξείδιο του θείου (SO₂) και το όζον (O₃).

Στις ανεπτυγμένες χώρες οι πολίτες εκτίθενται στην ατμοσφαιρική ρύπανση εσωτερικών χώρων λόγω των προϊόντων καύσης, των χημικών που προκύπτουν από καθαριστικά και προϊόντα οικιακής χρήσης καθώς και των αερομεταφερόμενων βακτηρίων και ιών. Αντίθετα στις αναπτυσσόμενες χώρες πιο έντονα παρατηρείται αυτό το φαινόμενο μόνο στα αστικά κέντρα. Επιπροσθέτως η καύση άνθρακα σε εσωτερικούς χώρους, η καύση ξύλων και

καυσίμων βιομάζας για μαγείρεμα και θέρμανση, έχουν οδηγήσει στην αύξηση των συγκεντώσεων PM, SO₂ και CO.

Οι βλαβερές επιπτώσεις της αέριας ρύπανσης στους ανθρώπους είναι ο βασικότερος λόγος των προσπαθειών που καταβάλλονται για την πλήρη κατανόηση και τον έλεγχο των πηγών εκπομπής των διαφόρων αερομεταφερόμενων ρύπων. Διακρίνονται οι οξείες επιδράσεις, όπου οι ρύποι δρουν για μικρό χρονικό διάστημα και σε δόσεις σχετικά υψηλές και οι χρόνιες επιδράσεις, όπου οι ρύποι δρουν σε μικρές δόσεις, ανεπαρκείς για να δημιουργήσουν μια άμεση δηλητηρίαση, αλλά με έναν επαναλαμβανόμενο τρόπο. Οι οξείες επιδράσεις προκαλούν συχνά τον θάνατο και δημιουργούνται συνήθως σε εσωτερικούς χώρους ή έχουν σχέση με τοξικά αέρια τα οποία απελευθερώνονται σε εξαιρετικές περιστάσεις (π.χ. βιομηχανικά ατυχήματα).^{[13],[14]}

Για την καλύτερη κατανόησή τους, οι συνέπειες της ατμοσφαιρικής ρύπανσης στην ανθρώπινη υγεία φαίνονται τοποθετημένες σε μορφή πυραμίδας με κριτήρια τη συχνότητα εμφάνισής τους και τη σοβαρότητά τους (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Πυραμίδα των επιπτώσεων της ατμοσφαιρικής ρύπανσης στην ανθρώπινη υγεία^[15]

2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΒΕΝΖΟΛΙΟ, ΤΟΛΟΥΟΛΙΟ, ΑΙΘΥΛΟΒΕΝΖΟΛΙΟ, ΞΥΛΟΛΙΟ (ΒΤΕΧ) ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΤΟΥΣ

Οι πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs) παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό της φωτοχημικής ρύπανσης. Πολλές εκατοντάδες VOCs έχουν βρεθεί στην αστική ατμόσφαιρα. Μερικές από τις ταξινομημένες ενώσεις όπως το βενζόλιο, το τολουόλιο, το αιθυλοβενζόλιο, το ξυλόλιο, η φορμαλδεΐδη και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ), ομαδοποιούνται στην κατηγορία των πιθανών καρκινογόνων που ενέχουν υψηλό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία.

Αυτή η ομάδα ενώσεων υφίσταται πολύπλοκες φωτοχημικές αντιδράσεις, προκαλώντας τη δημιουργία ενός αριθμού πολύ τοξικών και καρκινογόνων δευτερευόντων ρύπων, όπως το τροποσφαιρικό όζον και το νιτρικό υπεροξυακετύλιο, τα οποία είναι επιβλαβή τόσο για την ανθρώπινη υγεία όσο και για τη φύση.^[16]

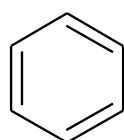
2.1 Βενζόλιο, Τολουόλιο, Αιθυλοβενζόλιο και Ξυλόλιο (ΒΤΕΧ)

2.1.1 Πηγές και χρήσεις των ΒΤΕΧ

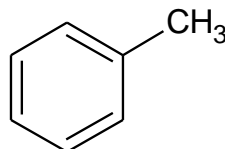
Το βενζόλιο, το τολουόλιο, το αιθυλοβενζόλιο και το ξυλένιο (ο-, m-, p-) είναι από τα πιο άφθονα παραγόμενα χημικά με παγκόσμια ετήσια παραγωγή 8 - 10 εκατομμύρια τόνων βενζολίου, 5 - 10 εκατομμύρια τόνων τολουολίου, 5 - 10 εκατομμύρια τόνων αιθυλοβενζολίου και 10 - 15 εκατομμύρια τόνων ξυλενίων. Τα ΒΤΕΧ είναι ευρέως διαδεδομένοι ρύποι των οποίων η κυκλοφορία οχημάτων και ο καπνός τσιγάρων είναι οι κύριες πηγές, παρόλο που υπάρχουν μικρές ποσότητες σε πόσιμο νερό και τρόφιμα, καθώς και σε υλικά βαφής και κόλλες. Εξ ου και τα ΒΤΕΧ και άλλες πτητικές οργανικές ενώσεις θα μπορούσαν να βρεθούν σε χώμα, νερό, καπνό τσιγάρων, κόλλες, χρώματα και βερνίκια, αναπνοή ή αίμα, αέρα και τρόφιμα.

Οι κυριότερες ποσότητες ΒΤΕΧ που απελευθερώνονται στο περιβάλλον, εισέρχονται στην ατμόσφαιρα άμεσα αλλά μπορούν να εισαχθούν και στο

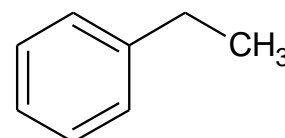
νερό και τα εδάφη από τα βιομηχανικά απόβλητα και τις πετρελαιοκηλίδες. Για παράδειγμα, όταν η βενζίνη έρχεται σε επαφή με το νερό, τα BTEX αντιπροσωπεύουν το 90% των συστατικών της βενζίνης που βρίσκονται στο υδατοδιαλυτό κλάσμα. Συχνά εμφανίζονται μαζί σε τοποθεσίες απόρριψης αποβλήτων.



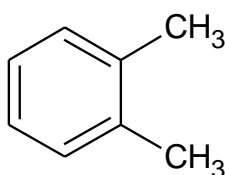
benzene



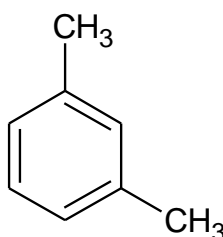
toluene



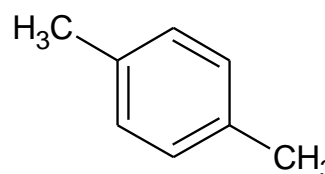
ethylbenzene



o-xylene



m-xylene



p-xylene

Σχήμα 2: Μοριακή δομή των BTEX

Η κυριότερη πηγή των VOCs στις αστικές περιοχές είναι οι εξατμίσεις των οχημάτων. Στην αστική ατμόσφαιρα η ομάδα των BTEX αποτελεί το 60% των VOCs (εξαιρουμένου του μεθανίου). Το αιθυλένιο, το βενζόλιο και το τολουόλιο είναι οι βασικές ουσίες που παράγονται κατά την εκπομπή καυσαερίου. Η χρήση των βιοκαυσίμων είναι μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση. Η χρήση εναλλακτικών βιοκαυσίμων αντί των παραδοσιακών παρουσιάζει μείωση των εκπομπών ρύπων κατά 14,5% - 24,5%. Οι εκπομπές των BTEX εμφανίστηκαν επίσης μειωμένες. Επομένως η χρήση βιοκαυσίμων αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για τη μείωση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης.

Μια άλλη σημαντική πηγή των BTEX είναι οι μπογιές και οι εκτυπώσεις. Το βενζόλιο, το τολουόλιο και τα m-, p- ξυλόλιο είναι τα σημαντικότερα είδη VOCs που εκπέμπονται από επιστρώσεις κτηρίων ή επίπλων. Κάποια καταναλωτικά προϊόντα όπως λευκαντικά, βερνίκια παπουτσιών και καθαριστικά δέρματος. Τα BTEX εντοπίστηκαν σε υψηλά επίπεδα σε χώρους εργασίας όπως τα φωτοτυπικά κέντρα και τα καταστήματα βαφής αυτοκινήτων. Το τολουόλιο είναι η πιο άφθονη ένωση των BTEX στις βαφές. Επομένως, το τολουόλιο υπήρχε πάντοτε στην ατμόσφαιρα εσωτερικού χώρου σε ανιχνεύσιμα επίπεδα που προκαλούνται από εκπομπές εσωτερικών πηγών (οι οργανικοί διαλύτες χρωμάτων και τα οικιακά καθαριστικά).

Ένα παράδειγμα εκτεταμένης χρήσης των BTEX στην παραγωγή βερνικιών/βαφών είναι η περίπτωση της αλκυδικής ρητίνης. Η παραγωγή των αλκυδικών ρητινών απαιτεί τροποποιητές όπως το τολουόλιο και το στυρόλιο για την παροχή ορισμένων επιθυμητών ιδιοτήτων στη ρητίνη, όπως μεγαλύτερη σκληρότητα, ανθεκτικότητα σε νερό και διαλύτες, γρήγορο στέγνωμα, καθώς και καλύτερη διατήρηση χρώματος και λάμψης. Τα ξυλόλια χρησιμοποιούνται στα συστήματα διαλυτών, και κατά την παραγωγή αλκυδικής ρητίνης λύματα νερού από τον αντιδραστήρα, διαρροές καυσίμων υδρογονανθράκων, αλλά και διαλύτες και τροποποιητές που χρησιμοποιούνται είναι δυνητικοί ρύποι του περιβάλλοντος χώρου. Η απελευθέρωση αυτών των ρύπων αποτελεί απειλή τόσο για τους κατοίκους βιομηχανικών περιοχών και των εργαζομένων στις βιομηχανίες αυτές, όσο και για την πανίδα της περιοχής.

Σημαντική πηγή BTEX στην ατμόσφαιρα είναι και η καύση άνθρακα. Το χειμώνα η καύση άνθρακα συνεισφέρει στην παραγωγή VOCs στην ατμόσφαιρα σε ποσοστό 28 – 39%. Σε αυτή την περίπτωση τα BTEX αντιπροσωπεύουν περίπου 61,1% - 94,8% των VOCs που παράγονται από την ατελή καύση άνθρακα ή ξύλου. Η σοβαρή αυτή ρύπανση από BTEX αποδίδεται κυρίως στην οικιακή καύση άνθρακα για θέρμανση κατά τη χειμερινή περίοδο. Το τολουόλιο είναι ένα από τα πιο άφθονα BTEX στα εργοστάσια καύσης άνθρακα (όπως θερμοηλεκτρικοί σταθμοί), όμως η κυριότερος ρύπος από την καύση άνθρακα είναι το βενζόλιο. Η αναλογία

βενζόλιο / τολουόλιο (B/T) στις περιπτώσεις βρίσκεται μεγαλύτερη του 1 και αυτός ο λόγος θεωρείται και δείκτης εκπομπών καύσης άνθρακα.^{[17].[18]}

2.1.2 Επιπτώσεις των BTEX στην ανθρώπινη υγεία

Η εισαγωγή των BTEX στο ανθρώπινο σώμα μπορεί να πραγματοποιηθεί με πολλούς, διαφορετικούς τρόπους. Αυτές οι τοξικές πτητικές οργανικές ενώσεις μπορούν να εισέλθουν στο σώμα με κατάποση μολυσμένων καλλιεργειών, εισπνοή ατμών από το έδαφος, πρόσληψη μολυσμένου πόσιμου νερού και έκθεση στο δέρμα.

Μετά την έκθεση σε BTEX, διάφοροι παράγοντες καθορίζουν εάν θα εμφανιστούν επιβλαβείς επιπτώσεις στην υγεία, καθώς και τον τύπο και τη σοβαρότητα τους. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν την ποσότητα των BTEX στις οποίες εκτίθενται τα άτομα, τη διάρκεια έκθεσης, αλλά και σε ποια ένωση BTEX έχουν εκτεθεί. Από τις τέσσερις ενώσεις BTEX, το βενζόλιο είναι το πιο τοξικό. Τα περισσότερα δεδομένα τοξικότητας είναι διαθέσιμα για αερομεταφερόμενη έκθεση στο BTEX, καθώς αυτή είναι η πιο κοινή οδός έκθεσης σε αυτές τις πτητικές ενώσεις.

Το βενζόλιο απορροφάται γρήγορα και αποτελεσματικά και διανέμεται ευρέως σε όλο το σώμα. Έκθεση σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις στον αέρα (10.000.000 ppb και άνω) μπορούν να προκαλέσουν θάνατο. Χαμηλότερα επίπεδα (700.000 - 3.000.000 ppb) μπορεί να προκαλέσουν υπνηλία, ζάλη, ταχυπαλμία, πονοκεφάλους, τρέμουλο, σύγχυση και απώλεια των αισθήσεων. Επίσης η μακροχρόνια έκθεση σε βενζόλιο είναι πιθανό να οδηγήσει σε λευχαιμία. Η κατανάλωση τροφίμων και ποτών που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις βενζολίου μπορεί να προκαλέσει εμετό, ερεθισμό του στομάχου, ζάλη, υπνηλία, σπασμούς, ταχυπαλμία ακόμα και να καταλήξει κώμα ή θάνατο.

Το τολουόλιο απορροφάται εύκολα από το γαστρεντερικό σωλήνα μετά την κατάποση και διανέμεται κατά προτίμηση σε λιπώδεις ιστούς, αργότερα στους νεφρούς, το ήπαρ και τον εγκέφαλο. Η κύρια επίδραση του τολουολίου είναι

στον εγκέφαλο και το νευρικό σύστημα, με την κόπωση και την υπνηλία να είναι τα πιο εμφανή συμπτώματα.

Το αιθυλοβενζόλιο απορροφάται και αυτό εύκολα από την ανθρώπινη γαστρεντερική οδό. Μελέτες σε ζώα δείχνουν διόγκωση ήπατος και νεφρών σε υψηλές δόσεις (400 mg / kg σωματικού βάρους ανά ημέρα). Παρατηρήθηκαν επίσης επιδράσεις στο ήπαρ σε έναν αριθμό μελετών εισπνοής. Σε γενικές γραμμές, η οξεία και χρόνια τοξικότητα είναι χαμηλή στους ανθρώπους, αν και συμπτώματα όπως ερεθισμός των ματιών και της αναπνευστικής οδού έχουν αναφερθεί σε υψηλά επίπεδα έκθεσης στον αέρα. Έκθεση σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις αιθυλοβενζολίου για αρκετές ημέρες έως εβδομάδες είχαν ως αποτέλεσμα δυνητικά μη αναστρέψιμη βλάβη στο εσωτερικό του αυτιού και την ακοή των ζώων.

Τα ξυλόλια απορροφώνται εύκολα μετά την εισπνοή. Τόσο η σύντομη όσο και η μακροχρόνια έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις ξυλολίου μπορεί επίσης να προκαλέσει μια σειρά επιδράσεων στο νευρικό σύστημα, όπως πονοκεφάλους, έλλειψη συντονισμού των μυών, ζάλη, σύγχυση και αλλαγές στην αίσθηση της ισορροπίας κάποιου, καθώς και ερεθισμό των ματιών και της αναπνευστικής οδού.^{[17],[19]}

2.2 Μεταβολίτες των BTEX

Μετά την πρόσληψη των BTEX από τον ανθρώπινο οργανισμό, ακολουθεί ο μεταβολισμός τους. Από τους πιο γνωστούς μεταβολίτες που προκύπτουν είναι το ιππουρικό οξύ, το μανδελικό οξύ, η κατεχόλη, η υδροκινόνη, το μουκονικό οξύ και τα ο-, m-, p- μεθυλ-ιππουρικό οξύ. Η κατεχόλη, η υδροκινόνη και το μουκονικό οξύ προκύπτουν από το μεταβολισμό του βενζολίου, το ιππουρικό οξύ από το μεταβολισμό του τολουολίου, το μανδελικό οξύ από το μεταβολισμό του αιθυλοβενζολίου, ενώ το μεθυλ-ιππουρικό οξύ από το μεταβολισμό του ξυλολίου.

2.2.1 Υδροκινόνη

Η βιομηχανική ανάπτυξη προκάλεσε τεράστια αύξηση στο απελευθέρωση δυνητικά τοξικών ενώσεων στην ατμόσφαιρα, τα υδάτινα σώματα και τα εδάφη. Τις τελευταίες δεκαετίες, οι περιβαλλοντικοί ρύποι έχουν συνδεθεί άμεσα με την αύξηση των ανθρώπινων ασθενειών, ιδιαίτερα αυτών που εμπλέκονται με το ανοσοποιητικό σύστημα. Η συμβολή του βενζολίου και των μεταβολιτών του στο αυτό το ζήτημα είναι αναγνωρισμένη, καθιστώντας τα πρόβλημα δημόσιας υγείας.

Η υδροκινόνη, ο κύριος μεταβολίτης του βενζολίου, είναι μια χημική ένωση που μπορεί να βρεθεί παντού στο περιβάλλον λόγω της ευρέως διαδεδομένης εφαρμογής της σε ανθρώπινες και βιομηχανικές δραστηριότητες. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας ανάπτυξης στη φωτογραφία, ενδιάμεση βαφή, σταθεροποιητής σε χρώματα, βερνίκια και καύσιμα κινητήρων. Επιπλέον η υδροκινόνη έχει χρησιμοποιηθεί ως αντιοξειδωτικό στη βιομηχανία τροφίμων και καουτσούκ.

Από το 1950 έως το 2001 υδροκινόνη βρήκε εφαρμογή στις διατιθέμενες στο εμπόριο καλλυντικές συνθέσεις λεύκανσης δέρματος σε χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και από το 1960 ήταν εμπορικά διαθέσιμο ως ιατρικό προϊόν. Είναι επίσης παρούσα σε καλλυντικές συνθέσεις για βερνίκια νυχιών και βαφές μαλλιών.

Από την άλλη πλευρά η υδροκινόνη μπορεί να είναι συστατικό αρωματικών ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους (π.χ. ρητίνες), ένα ενδιάμεσο ή να εμφανίζονται ως προϊόν αποικοδόμησης προερχόμενο από μετασχηματισμό αρωματικών ενώσεων. Οι διεργασίες οξείδωσης αρωματικών ενώσεων και ιδιαίτερα της φαινόλης, αποδίδουν πολλά παράγωγα του βενζολίου όπως υδροκινόνη, κατεχόλη και ρεσορκινόλη, ως ενδιάμεσοι μεταβολίτες του μετασχηματισμού του.

Σε ό,τι αφορά τις ιδιότητες της υδροκινόνης, είναι μια αρωματική ουσία αποτελούμενη από ένα βενζολικό δακτύλιο και δύο υδροξυλομάδες σε p-θέση. Η υδροκινόνη είναι διαλυτή στο νερό, τη μεθανόλη και τον αιθέρα. Ωστόσο έχει μικρότερη διαλυτότητα στο νερό σε σχέση με την κατεχόλη

(υδροξυλομάδες σε ο-θέση) και τη ρεσορκινόλη (υδροξυλομάδες σε m-θέση) και αυτό έχει ως αποτέλεσμα και τη μικρότερη συγγενεία της με υδατικούς διαλύτες.

Η υδροκινόνη αυτοοξειδώνεται μέσω δύο διαδοχικών οξειδώσεων ενός ηλεκτρονίου, παράγοντας ένα εξαιρετικά δραστικό ενδιάμεσο ημικινόνης, το οποίο είναι το πιο δραστικό και τοξικό ενδιάμεσο από όλα τα είδη κινόνης. Επίσης η υδροκινόνη μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα με διάφορα δισθενή και τρισθενή μεταλλικά ιόντα όπως του χαλκού και του σιδήρου. Στην περίπτωση του χαλκού το σύμπλοκο που σχηματίζεται αυξάνει την παραγωγή του H_2O_2 από την υδροκινόνη και επάγει την αυτοοξειδωσή της σε βενζοκινόνη.

Η παραγωγή της υδροκινόνης μπορεί να γίνει στον οργανισμό μέσω βιομετατροπής της φαινόλης ή του βενζολίου. Το βενζόλιο πρώτα μεταβολίζεται στο ήπαρ από τη μονοοξυγενάση κυτοχρώματος P450, σε φαινόλη. Περαιτέρω υδροξυλίωση της φαινόλης από τη μονοοξυγενάση κυτοχρώματος P450 ή από την ανθρώπινη υπεροξειδάση οδηγεί κυρίως στο σχηματισμό υδροκινόνης, η οποία συσσωρεύεται στο μυελό των οστών.

Γενικά υπάρχουν τρεις χημικές διαδικασίες μέσω των οποίων μπορεί να παραχθεί υδροκινόνη και περιλαμβάνουν αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και αλκυλίωσης. Ο πρώτος τρόπος είναι αυτός που προαναφέρθηκε, δηλαδή με οξείδωση της φαινόλης. Ο δεύτερος τρόπος είναι η οξείδωση της ανιλίνης με διοξειδίο του μαγγανίου σε όξινες συνθήκες, ακολουθούμενη από αναγωγή με σκόνη σιδήρου σε υδατικό μέσο. Τέλος, παραγωγή υδροκινόνης μπορεί να γίνει με αλκυλίωση του βενζολίου με προπυλένιο για να δημιουργηθεί το παρα-δι-ισοπροπυλοβενζόλιο, που οξειδώνεται και παράγει το αντίστοιχο διϋδροϋπεροξειδίο, το οποίο στη συνέχεια υποβάλλεται σε επεξεργασία με ένα οξύ για την παραλαβή της υδροκινόνης.

Τα τελευταία χρόνια δεν είναι λίγες οι αναφορές σχετικά με την τοξικότητα της υδροκινόνης. Πράγματι έχει αναφερθεί ότι η υδροκινόνη προκαλεί μονοπυρηνική κυτταρική λευχαιμία, νεφρικούς κυτταρικούς όγκους και καρκίνο του ήπατος σε τρωκτικά. Έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό μετασχηματισμό και έχει γενετοξική δράση σε κύτταρα θηλαστικών σε καλλιέργεια. Μετά από κυτταροθεραπεία με υδροκινόνη, αυξήθηκε η

συχνότητα εμφάνισης κενών και σπασιμάτων στην έλικα του DNA, όπως και οι ανταλλαγές μεταξύ των αδερφών χρωματίδων και οι εκτροπές χρωμοσωμάτων. Επιπλέον, ο συνδυασμός υδροκινόνης, κατεχόλης και φαινόλης έχει συνεργιστική δράση προκαλώντας οξειδωτική βλάβη στο DNA και γενοτοξικότητα σε κύτταρα θηλαστικών *in vivo*.^[20]

2.2.2 Κατεχόλη

Η κατεχόλη ή αλλιώς 1,2 διυδροξυ βενζόλιο, είναι και αυτή όπως η υδροκινόνη προϊόν του μεταβολισμού του βενζολίου. Χρησιμοποιείται σε μια ποικιλία εφαρμογών όπως ως αντιδραστήριο στη φωτογραφία, για βαφή γούνας, στην παραγωγή πλαστικού και καουτσούκ και στη φαρμακευτική βιομηχανία.

Στο περιβάλλον η κατεχόλη απαντάται φυσικά σε φρούτα και λαχανικά όπως κρεμμύδια, μήλα και ακατέργαστα ζαχαρότευτλα, καθώς και σε δέντρα όπως πεύκο, βελανιδιά και ιτιά. Η κατεχόλη μπορεί να απελευθερωθεί στο περιβάλλον κατά την παρασκευή και τη χρήση του. Έχει εντοπιστεί σε χαμηλά επίπεδα σε δείγματα ατμοσφαιρικού αέρα, υπόγειων υδάτων, πόσιμου νερού και εδάφους. Έχει επίσης βρεθεί σε απόβλητα από μετατροπή άνθρακα, χημική παραγωγή πίσσας και ασφαλτούχου σχιστόλιθου. Τέλος, υποκατεστημένες κατεχόλες, ιδιαίτερα χλωριωμένες και μεθυλιωμένες βρίσκονται συχνά σε ελαιοτριβεία ή χώρους παραγωγής χαρτομάζας ως παραπροϊόντα.

Σε ανθρώπους και θηλαστικά, οι κατεχόλες μπορούν να εμφανιστούν ως μεταβολίτες στην αποδόμηση του βενζολίου ή των οιστρογόνων ή ως ενδογενείς ενώσεις, όπως νευροδιαβιβαστές και τους προδρόμους τους [αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη, ντοπαμίνη και L-DOPA (L-3,4-διυδροξυ φαινυλαλανίνη)]. Επιπλέον οι κατεχόλες μπορούν να ληφθούν από τον καπνό του τσιγάρου ως κατεχόλη, ημικινόνες κατεχόλης και πολυμερισμένες κατεχόλες, ή ως συστατικά τροφίμων (π.χ. κατεχόλη, ντοπαμίνη, καφεϊκό οξύ, κατεχίνη τσαγιού).

Το 1950, προτάθηκε ότι οι μεταβολίτες του βενζολίου ήταν υπεύθυνοι για την τοξικότητα του βενζολίου σε θηλαστικά και ανθρώπους και η κατεχόλη είχε ήδη αναγνωριστεί ως ένας από αυτούς τους μεταβολίτες στο τέλος του προηγούμενου αιώνα.

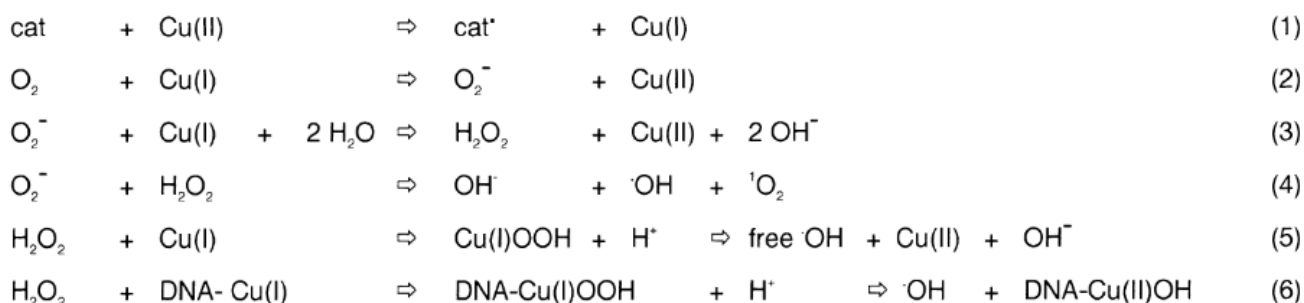
Για τη μελέτη της τοξικότητας της κατεχόλης θα πρέπει πρώτα να εξεταστεί ο σχηματισμός συμπλόκων της κατεχόλης με ορισμένα μέταλλα, καθώς και η συμμετοχή της σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Οι κατεχόλες μπορούν να σχηματίσουν σταθερά σύμπλοκα με αρκετά δισθενή και τρισθενή ιόντα μετάλλων, με τα σύμπλοκα των τρισθενών ιόντων να είναι τα σταθερότερα. Επίσης οι κατεχόλες μπορούν να συμμετάσχουν σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και κυκλικές μετατροπές ανάμεσα σε κατεχόλες, ρίζες ημικινονών και ο – βενζοκινόνης.

Τα σύμπλοκα της κατεχόλης έχουν μελετηθεί πιο εκτεταμένα με τα ιόντα σιδήρου (Fe). Αναλόγως με το pH σχηματίζονται και διαφορετικά σύμπλοκα. Τα σύμπλοκα του Fe(II) σχηματίζονται κυρίως σε όξινο pH, ενώ τα σύμπλοκα του Fe(III) σε pH μεγαλύτερο του 7. Επίσης ο αριθμός σύνταξης αυτών των συμπλόκων εξαρτάται από την αναλογία σιδήρου – κατεχόλης. Τα σύμπλοκα με αριθμό σύνταξης 1 σχηματίζονται κατά προτίμηση σε υψηλές αναλογίες, ενώ αυτά με αριθμό σύνταξης 3 κυριαρχούν στις χαμηλές αναλογίες. Εξαιτίας της μεγάλης σταθερότητας των συμπλόκων κατεχόλης – μετάλλων, οι ενώσεις που περιέχουν κατεχολικούς πυρήνες μπορούν να αποσπάσουν μέταλλα από άλλα σύμπλοκα και με αυτό τον τρόπο να εμποδίσουν τη συμμετοχή των μετάλλων αυτών σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής.

Όταν η κατεχόλη οξειδώνεται ενζυματικά ή παρουσία οξυγόνου και βαρέων μετάλλων, γίνεται μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στο μοριακό οξυγόνο με αποτέλεσμα το σχηματισμό του σουπεροξειδίου (O_2^{2-}). Παρουσία βαρέων μετάλλων (όπως Cu, Fe) το σουπεροξειδίο ανάγεται περαιτέρω σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και ρίζες υδροξυλίου ($\cdot OH$) τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των ROS (Reactive Oxygen Species). Τα ROS μπορεί να αποβούν ιδιαίτερα επιβλαβή για τα κύτταρα αν δεν εξαιρεθούν.

Επομένως η κατεχόλη από μόνη της δεν έχει γενετοξικές ιδιότητες. Όταν όμως συνδυαστεί με ιόντα βαρέων μετάλλων (όπως Cu^{2+} , Fe^{3+}) και παρουσία

μοριακού οξυγόνου, μπορεί να παρατηρηθούν σπασίματα στην αλληλουχία του DNA. Για παράδειγμα σπάσιμο στους κλώνους του DNA μπορεί να προκληθεί από αντίδραση οξειδοαναγωγής του Cu(II) με την κατεχόλη προς σχηματισμό Cu(I) και ρίζας σεμικινόνης και από την ακόλουθη αναγωγή μοριακού οξυγόνου (καταλυόμενη από Cu(I)), όπου σχηματίζονται σουπεροξειδίο και υπεροξειδίο του υδρογόνου. Η πορεία αυτών των αντιδράσεων παρουσιάζεται αναλυτικά και στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 2).^{[21],[22]}



Εικόνα 2: Παραγωγή ριζών υδροξυλίου παρουσία χαλκού και οξυγόνου που οδηγεί στην αποδόμηση του DNA.^[22]

2.2.3 Μουκονικό οξύ

Η τοξικότητα του βενζολίου έχει τεκμηριωθεί ότι συνεπάγεται το μεταβολισμό του με ορισμένα δραστικά ενδιάμεσα τα οποία συνδέονται με κυτταρικά συστατικά, παρεμποδίζοντας έτσι τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Το μουκονικό οξύ αν και αποτελεί μεταβολίτη του βενζολίου δεν έχει τοξικές ιδιότητες. Παρόλο που το trans, trans – μουκονικό οξύ (tt MA) έχει αναφερθεί ως μεταβολίτης του βενζολίου στα ούρα από τις αρχές του 1900, μόλις τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωριστεί η σημασία του ως βιολογικός δείκτης για την επαγγελματική και περιβαλλοντική έκθεση σε βενζόλιο.

Η κατάταξη του βενζολίου ως καρκινογόνος ουσία από το Διεθνή Οργανισμό Ερευνών για τον Καρκίνο (IARC), έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων επαγγελματικής έκθεσης σε βενζόλιο και κατά συνέπεια την ανάγκη

ανάπτυξης βελτιωμένων τεχνικών βιοπαρακολούθησης. Το tt – μουκονικό οξύ είναι ο πιο ευαίσθητος και ειδικός μεταβολίτης για την έκθεση σε βενζόλιο, καθώς μπορεί να ανιχνευτεί στα ούρα σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες του 1ppm.

Όπως ήδη προαναφέρθηκε, το μουκονικό οξύ προκύπτει από το μεταβολισμό του βενζολίου. Το βενζόλιο μεταβολίζεται στο ήπαρ σε μια σειρά κυκλικών υδροξυλιωμένων και συζευγμένων μεταβολιτών, καθώς και σε προϊόντα με ανοιγμένους δακτυλίους που απεκκρίνονται στα ούρα. Περίπου το 12% της πρόσληψης βενζολίου εκπνέεται αμετάβλητο και 0,1 - 0,2% εμφανίζεται αμετάβλητο στα ούρα.

Το πρώτο βήμα στο μεταβολισμό του βενζολίου είναι το σχηματισμός του δραστικού ενδιάμεσου εποξειδίου του βενζολίου που θα πρέπει να βρίσκεται σε ισορροπία με το ασταθές οξεπίνιο. Το σύστημα εποξειδίου του βενζολίου – οξεπίνης σχηματίζεται πιθανώς ενζυμικά από το κυτόχρωμα P450 2E1 μέσω μιας οδού δραστικών ριζών υδροξυλίου. Τα δραστικά ενδιάμεσα του βενζολίου (εποξείδιο - οξεπίνιο) μπορεί να υπόκεινται σε τουλάχιστον τέσσερις μεταβολικές οδούς, θα εξεταστούν όμως μόνο εκείνες που οδηγούν στην παραγωγή του tt – μουκονικού οξέος και αναλύονται παρακάτω:

Το εποξείδιο του βενζολίου μπορεί να υδρολυθεί με το ένζυμο υδρολάση εποξειδίου και να παραχθεί διυδροδιόλη βενζολίου (η επονομαζόμενη και γλυκόλη βενζολίου). Στη συνέχεια η διυδροδιόλη μπορεί να αφυδρογονωθεί σε κατεχόλη ή να γίνει διάνοιξη του δακτυλίου για να σχηματιστεί η trans, trans – μουκοναλδεΰδη που είναι η πρόδρομη ένωση του tt – μουκονικού οξέος.

Εκτός από την προαναφερθείσα οδό μέσω διυδροδιόλης βενζολίου, έχει υποστηριχθεί και ένας αριθμός περαιτέρω μεταβολικών οδών για την αποδότηση της trans, trans – μουκοναλδεΰδης. Το εποξειδωμένο εποξίνιο μπορεί να αναδιαταχθεί σε μουκοναλδεΰδη. Επιπλέον, το 1 – υδροξυ – 2 - υδροϋπεροξυ - 3,5 - κυκλοεξαδιένιο μπορεί να σχηματιστεί από βενζόλιο μέσω αντίδρασης με ρίζες υδροξυλίου και επακόλουθη υπεροξειδωση πριν από το άνοιγμα του δακτυλίου για να αποδώσει μουκοναλδεΰδη.

Μετά το σχηματισμό της, η trans, trans – μουκοναλδεΐδη υποβάλλεται σε αναγωγή με αλκοολικές αφυδρογονάσεις για να σχηματίσει αλκοόλες και οξειδωση από αλδεϋδικές αφυδρογονάσεις για να δώσει καρβοξυλικά οξέα. Μεταξύ των προϊόντων του μεταβολισμού της μουκοναλδεΐδης, μόνο το ttMA είναι ένας πιθανός βιοδείκτης για την έκθεση στο βενζόλιο. Περίπου 2 – 25% της συνολικής δόσης βενζολίου απεκκρίνεται ως ttMA στα ούρα. Ο βιολογικός χρόνος υποδιπλασιασμού του tt – μουκονικού οξέος στους ανθρώπους εκτιμάται ότι είναι $5 \pm 2,3$ ώρες.

Για τον προσδιορισμό του tt – μουκονικού οξέος στα ούρα, η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω της καλής απόδοσης στο διαχωρισμό πολικών, μη πτητικών ενώσεων, χωρίς την ανάγκη παραγωγοποίησης και της εκλεκτικής ανίχνευσης με ανιχνευτή UV ενός μήκους κύματος ή φωτοδιόδων. Πολύ συνηθισμένη επίσης είναι και η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας και αυτό γιατί προσφέρει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα από την HPLC και οι παρεμποδίσεις της μήτρας είναι εύκολο να εξαλειφθούν. Ειδικά με την προσθήκη ανιχνευτή μάζας, διασφαλίζεται η ταυτοποίηση των αναλυτών και οδηγούμαστε σε πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.^{[23],[24],[25]}

2.2.4 Μανδελικό οξύ

Το μανδελικό οξύ, είναι ένα άλφα υδροξυ – οξύ. Πρόκειται για μια μη τοξική ουσία που όταν ληφθεί από το στόμα τελικά απεκκρίνεται μέσω των ούρων. Έχει χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά ως αντισηπτικό ούρων για την πραγματοποίηση ουρολογικών εξετάσεων, ενώ μια ακόμα πολύ διαδεδομένη εφαρμογή του είναι στην επανόρθωση του δέρματος μετά από παρατεταμένη έκθεση στον ήλιο αλλά και στην αισθητική ιατρική, στην αντιμετώπιση διαφόρων μορφών ακμής και στις αγωγές κατά των ρυτίδων.

Ιδιαίτερα στην επανόρθωση του δέρματος το μανδελικό οξύ έχει κερδίσει μεγάλη δημοτικότητα λόγω των φυσικών και χημικών του ιδιοτήτων. Παρουσιάζει αρκετά αργή διείσδυση στο δέρμα και πολύ καλή ανεκτικότητα

από τους ασθενείς με ευαίσθητο δέρμα. Διαθέτει στη δομή του έναν αρωματικό δακτύλιο που του προσφέρει λιποφιλικές ιδιότητες (μεγαλύτερη συγγένεια με το δέρμα. Σε όξινο περιβάλλον καταδεικνύει βακτηριοστατικές και βακτηριοκτόνες ιδιότητες, ειδικά για τα ακόλουθα στελέχη βακτηρίων: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus proteus*, *Escherichia coli* και *Aerobacter aerogenes*.

Συνολικά δηλαδή μπορούμε να καταλήξουμε με ασφάλεια στο συμπέρασμα ότι η απολέπιση με μανδελικό οξύ είναι μια αποτελεσματική, ασφαλής και ανεκτή από το δέρμα μέθοδος. Μπορεί να μειώσει τις επιπτώσεις των διαδικασιών γήρανσης, ειδικά την ξηρότητα ρυθμίζοντας την έκκριση σμήγματος στις περιοχές όπου μειώνεται σημαντικά με την πάροδο του χρόνου.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το μανδελικό οξύ προέρχεται από το μεταβολισμό του αιθυλοβενζολίου. Το αιθυλοβενζόλιο βρίσκεται φυσικά σε πίσσα και πετρέλαιο και χρησιμοποιείται στη διαδικασία παραγωγής στυρολίου. Τόσο το στυρόλιο όσο και το αιθυλοβενζόλιο ταξινομούνται από τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) ως παράγοντες της ομάδας 2B, δηλαδή πιθανώς καρκινογόνοι για τον άνθρωπο. Γι' αυτό το λόγο είναι πολύ χρήσιμο να μπορεί το μανδελικό οξύ να λειτουργήσει σαν δείκτης έκθεσης σε αιθυλοβενζόλιο, μέσω προσδιορισμού στα ούρα.

Η μεταβολική οδός που ακολουθεί το αιθυλοβενζόλιο όταν εισέλθει στο ανθρώπινο σώμα είναι η ακόλουθη. Το αιθυλοβενζόλιο αρχικά υδροξυλιώνεται στην πλευρική αλυσίδα και οξειδώνεται περαιτέρω σε φαινυλαιθυλενογλυκόλη, τον ίδιο μεταβολίτη του στυρολίου. Επακόλουθη οξείδωση μετατρέπει τη φαινυλαιθυλενογλυκόλη σε μανδελικό οξύ.

Παρόλο που ούτε το αιθυλοβενζόλιο, ούτε το στυρόλιο είναι χειρόμορφα μόρια, το μανδελικό οξύ διαθέτει στερεογονικό κέντρο και κατά συνέπεια υπάρχουν τα R και S εναντιομερή. Σύμφωνα με έρευνα που διεξήχθη, άνθρωποι που εκτέθηκαν σε συγκέντρωση 100 ppm στυρολίου παρουσίασαν ως μεταβολίτες και τα δύο εναντιομερή του μανδελικού οξέος σε αναλογία 1:1, ενώ μετά από έκθεση σε αιθυλοβενζόλιο βρέθηκε ως μεταβολίτης μόνο το R – εναντιομερές στα ούρα.^{[26] - [29]}

2.2.5 Ιππουρικό οξύ και μεθυλ – ιππουρικό οξύ

Οι ευρέως χρησιμοποιούμενοι βιομηχανικοί διαλύτες τολουόλιο και ξυλόλιο έχουν φυσικοχημικές ιδιότητες που μπορεί να έχουν επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων και ιδιαίτερα στους εργαζόμενους που εκτίθενται συστηματικά σε αυτούς. Το τολουόλιο για παράδειγμα, μπορεί να προκαλέσει ανατομικές αλλαγές στον εγκέφαλο και νευροσυμπεφορικές διαταραχές. Τέτοιες επιπτώσεις είναι πιθανό να παρατηρηθούν ακόμα με έκθεση σε συγκεντρώσεις κάτω των 50 ppm.

Το ιππουρικό και το μεθυλ – ιππουρικό οξύ, που αντιπροσωπεύουν τα προϊόντα βιομετατροπής του τολουολίου και του ξυλολίου (ο-, m-, p-) αντίστοιχα, χρησιμοποιούνται ως βιολογικοί δείκτες σε μελέτες έκθεσης σε αυτούς τους ευρέως χρησιμοποιούμενους διαλύτες, λόγω της καλής συσχέτισης που δείχνουν με το επίπεδο έκθεσης.

Η κύρια μεταβολική οδός του τολουολίου είναι ο σχηματισμός βενζυλικής αλκοόλης, μια αντίδραση που καταλύεται κυρίως από το μικροσωμικό σύστημα κυτοχρώματος P-450. Περαιτέρω οξείδωση σε βενζαλδεΐδη και βενζοϊκό οξύ καταλύεται από αλκοολικές και αλδεϋδικές αφυδρογονάσεις. Στη συνέχεια το οξύ συζεύγνυται με γλυκίνη και παράγεται ιππουρικό οξύ. Περίπου το 80% του απορροφούμενου τολουολίου απεκκρίνεται στα ούρα ως ιππουρικό οξύ στους ανθρώπους. Εκτός από το ιππουρικό οξύ μία μικρή ποσότητα του απορροφούμενου τολουολίου (<1%) οξειδώνεται στον αρωματικό δακτύλιο και απεκκρίνεται στα ούρα ως ο- και p- κρεσόλη. Τέλος μεταξύ 7% και 14% του απορροφηθέντος τολουολίου απεκκρίνεται αμετάβλητο με την εκπνοή.

Ωστόσο χρειάζεται προσοχή στη χρήση του ιππουρικού οξέος ως δείκτη για την έκθεση σε τολουόλιο, καθώς πρόκειται για έναν κοινό μεταβολίτη του βενζοϊκού οξέος. Το μεγαλύτερο μέρος του βενζοϊκού οξέος προέρχεται από διατροφικά συστατικά, ενώ ένα μικρότερο μέρος απεκκρίνεται ως αποτέλεσμα του ενδιάμεσου μεταβολισμού αμινοξέων.

Σχετικά με το μεταβολισμό του ξυλολίου, περίπου το 95% της απορροφούμενης ποσότητας μεταβολίζεται γρήγορα στο ήπαρ με οξείδωση

της αλειφατικής πλευρικής αλυσίδας. Τα μεθυλοβενζοϊκά οξέα που παράγονται με αυτόν τον τρόπο απεκκρίνονται στα ούρα ως μεθυλ - ιππουρικά οξέα μετά από σύζευξη με αμινοξικό οξύ (γλυκίνη). Η μικρή ποσότητα του ξυλολίου που απομένει μεταβολίζεται με υδροξυλίωση του αρωματικού δακτυλίου σε ξυλενόλες. Υπάρχουν διαφορές στην αναλογία των μεταβολιτών που σχηματίζονται σύμφωνα με τα ισομερή του ξυλολίου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ο βιολογικός χρόνος υποδιπλασιασμού του μεθυλ - ιππουρικού οξέος κυμαίνεται μεταξύ 3,6 και 5,2 ωρών. Έτσι μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι το μεγαλύτερο μέρος των μεθυλ - ιππουρικών οξέων αποβάλλεται από τον οργανισμό σε 24 ώρες.

Για τον προσδιορισμό του ιππουρικού οξέος και των μεθυλ - ιππουρικών οξέων στα ούρα, έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία πολλές μέθοδοι προσδιορισμού που περιλαμβάνουν τεχνικές όπως η αέρια χρωματογραφία (GC), η φασματοφωτομετρία και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Ωστόσο το μειονέκτημα με τις παραπάνω τεχνικές είναι ότι είναι χρονοβόρες και απαιτούν ιδιαίτερη προετοιμασία δειγμάτων. Για παράδειγμα κατά τον προσδιορισμό με GC είναι απαραίτητο το βήμα της παραγωγοποίησης.

Εξαιτίας των παρεμποδίσεων που προκύπτουν από τα συστατικά της μήτρας των δειγμάτων ούρων, αλλά και των χαμηλών επιπέδων συγκέντρωσης του ιππουρικού και των μεθυλ - ιππουρικών οξέων, προκύπτει η ανάγκη για μια αποτελεσματική προπαρασκευαστική μέθοδο με παράγοντες καθαρισμού και εμπλουτισμού πριν την ανάλυση. Μέχρι σήμερα, οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι καθαρισμού του δείγματος και προσυγκέντρωσης είναι η συμβατική εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και η εκχύλιση υγρού - υγρού (LLE).

Στην παραδοσιακή SPE, το προσροφητικό υλικό πρέπει να είναι είτε ενσωματωμένο μέσα στις στήλες SPE. Αυτή η διαδικασία είναι χρονοβόρα και κουραστική, γι' αυτό αναπτύχθηκε η εκχύλιση στερεάς φάσης με διασπορά (D - SPE). Κατά την εκχύλιση στερεάς φάσης με διασπορά, η εκχύλιση του αναλύτη πραγματοποιείται σε διάλυμα χύδην. Σε σύγκριση με την κλασική SPE, κατά την D - SPE οι αναλύτες αλληλεπιδρούν με όλα τα προσροφητικά σωματίδια που είναι διασπαρμένα στο διάλυμα, κάτι το οποίο αυξάνει την

απορροφητική ικανότητα του προσροφητικού υλικού και ταυτόχρονα αποτρέπει το μπλοκάρισμα της στήλης SPE. Χάρη λοιπόν σε αυτή την τεχνική εκχύλισης η προκατεργασία του δείγματος ολοκληρώνεται γρηγορότερα και μπορεί άμεσα να ακολουθήσει η ανάλυση των δειγμάτων.^{[30] - [35]}

3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΚΑΙ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

3.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα μελέτη η ανίχνευση και ο προσδιορισμός των μεταβολιτών των BTEX έγινε με χρήση αεριοχρωματογράφου συζευγμένου με φασματοόμετρο μαζών (GC/MS). Ένα τέτοιο σύστημα, συνδυάζει αποτελεσματικό διαχωρισμό συστατικών με επιλεκτική και ευαίσθητη ανίχνευση. Η φασματομετρία μαζών (mass spectrometry) είναι μια από τις σημαντικότερες μεθόδους προσδιορισμού δομής και μοριακού βάρους των οργανικών ενώσεων. Η καταγραφή του φάσματος γίνεται με εξαιρετική ακρίβεια, επιδέχεται διορθώσεις και με τεράστιες βάσεις δεδομένων μπορεί κανείς να έχει τη σύγκριση της αναζητούμενης δομής των οργανικών ενώσεων που αναλύει^{[36],[37]}

3.2 Αέρια χρωματογραφία

Οι χρωματογραφικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται όχι μόνο για το διαχωρισμό των συστατικών αλλά και ταυτόχρονα για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Η χρωματογραφία είναι μια διαδικασία διαχωρισμού όπου ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με την κατανομή της ουσίας μεταξύ της στατικής φάσης και της κινητής φάσης. Όσο ισχυρότερες είναι οι δυνάμεις μεταξύ της στατικής φάσης και της διαλυμένης ουσίας τόσο μεγαλύτερη είναι η κατακράτηση στη στήλη. Με την αλλαγή των δυνάμεων που ελέγχουν την κατανομή των μορίων διαλυμένης ουσίας - χημικές δυνάμεις, ιονικές δυνάμεις πολικές δυνάμεις και δυνάμεις διασποράς – επηρεάζεται και ο διαχωρισμός και η ανάλυση των συστατικών.

Η αέρια χρωματογραφία είναι μια χρωματογραφική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό πτητικών οργανικών ενώσεων. Η αέρια χρωματογραφία περιλαμβάνει ένα δείγμα που εξατμίζεται και εγχέεται στην κεφαλή της χρωματογραφικής στήλης. Το δείγμα μεταφέρεται μέσω της

στήλης με τη ροή αδρανούς, αέριας κινητής φάσης (φέρον αέριο). Η ίδια η στήλη περιέχει μια υγρή στατική φάση προσροφημένη στην επιφάνεια αδρανούς στερεού.

Ένας αεριοχρωματογράφος αποτελείται από μια ρέουσα κινητή φάση, τον εισαγωγέα δείγματος, μια στήλη διαχωρισμού που περιέχει τη στατική φάση και έναν ανιχνευτή. Οι ενώσεις διαχωρίζονται με βάση τις διαφορές τους κατά την κατανομή τους μεταξύ της κινητής φάσης αερίου και της στατικής φάσης στη στήλη.

Το φέρον αέριο πρέπει να είναι χημικά αδρανές. Τα αέρια που χρησιμοποιούνται συνήθως περιλαμβάνουν άζωτο, ήλιο, αργό και διοξείδιο του άνθρακα. Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται συχνά από τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι ή υψηλής καθαρότητας και το σύστημα περιέχει συνήθως μοριακό κόσκινο για την απομάκρυνση του νερού και άλλων ακαθαρσιών.

Σε ό,τι αφορά το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, οι πιο συνηθισμένοι τρόποι εισαγωγής είναι η χρήση μικροσύριγγας και βαλβίδας. Η περιοχή στην οποία εισάγεται το δείγμα πρέπει να διατηρείται σε υψηλή θερμοκρασία, έτσι ώστε το δείγμα να ατμοποιείται γρήγορα. Γι' αυτό και η θερμοκρασία του εισαγωγέα είναι συνήθως 50°C υψηλότερη από το σημείο ζέσεως του λιγότερο πτητικού συστατικού του δείγματος.

Για τη βέλτιστη απόδοση της στήλης, το δείγμα εισάγεται πάντα στη στήλη σε όσο μικρότερο όγκο γίνεται. Για πακεταρισμένες στήλες, το μέγεθος του δείγματος κυμαίνεται από 1 έως 5μL, ενώ για τις τριχοειδείς στήλες, από την άλλη πλευρά, χρειάζεται πολύ λιγότερο δείγμα περίπου 0,5μL. Επειδή οι τριχοειδείς στήλες μπορούν να δεχτούν μικρή ποσότητα δείγματος, χρειάζεται ένα σύστημα εισαγωγής διαμοιρασμού (split injection), όπου ένα μέρος του φέροντος αερίου περνά από την κορυφή της στήλης και αποβάλλεται χωρίς να περάσει μέσα από αυτή (διαμοιρασμός). Καθώς το δείγμα περνά από την κορυφή της στήλης κλάσμα αυτού εισέρχεται σε αυτή. Η αναλογία διαμοιρασμού ρυθμίζεται με ρύθμιση του κλάσματος του φέροντος αερίου που αποβάλλεται. Σε τριχοειδείς στήλες μεγαλύτερης διαμέτρου μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η τεχνική εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της

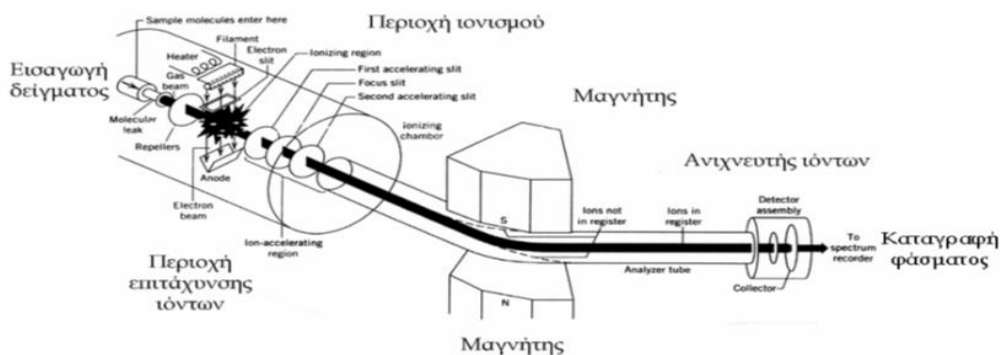
στήλης. Σε αυτή την περίπτωση δεν πραγματοποιείται διαμοιρασμός του φέροντος αερίου και κατ' επέκταση του δείγματος (splitless injection).

Όπως προαναφέρθηκε, στην αέρια χρωματογραφία ο διαχωρισμός των συστατικών στη στήλη πραγματοποιείται με βάση τις φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις των συστατικών με τη στατική φάση. Ο διαχωρισμός εξαρτάται από τον τύπο στατικής φάσης, το πάχος του φιλμ, την εσωτερική διάμετρο της στήλης και το μήκος της.

Η στατική φάση καθορίζει την ικανότητα της στήλης να διαχωρίζει τα συστατικά του δείγματος. Η επιλογή της στατικής φάσης βασίζεται στην ακόλουθη χημική αρχή: μια μη πολική στήλη είναι καλύτερη για το διαχωρισμό των μη πολικών αναλυτών και οι πολικές στήλες διαχωρίζουν αποτελεσματικά τους πολικούς αναλύτες. Η πολικότητα της στατικής φάσης καθορίζεται από τη δομή του πολυμερούς, που αποτελεί τη στατική φάση. Μια μη πολική στήλη (στατική φάση: π.χ. πολυδιμέθυλο – σιλοξάνιο) διαχωρίζει τους αναλύτες σύμφωνα με τα σημεία βρασμού τους και τη διαφορετική τους τάση ατμών. Με την αντικατάσταση ομάδων μεθυλενίου στη στατική φάση από ομάδες φαινυλίου ή κυανοπροπυλίου, αυξάνεται η πολικότητα της στατικής φάσης. Οι πολικές στατικές φάσεις βασίζονται στις πολυαιθυλενογλυκόλες και ο διαχωρισμός πραγματοποιείται λόγω της πολικότητας και των σημείων ζέσεως των ενώσεων. Το στερεό υλικό επικαλύπτεται ομοιόμορφα με πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους όπως σιλοξάνες. Αυτά τα υλικά σε υψηλές θερμοκρασίες στηλών λιώνουν και μετατρέπονται σε υγρά φιλμ πάνω στα πορώδη υλικά, επιτυγχάνοντας έτσι καλύτερο διαχωρισμό.^[38]

3.3 Φασματόμετρο μαζών

Το φασματόμετρο μαζών είναι ένα όργανο που με τη βοήθεια ηλεκτρονικού βομβαρδισμού τεμαχίζει την ουσία που μελετάται παράγοντας ιόντα. Τα ιόντα αυτά επιταχύνονται με τη βοήθεια ισχυρού μαγνητικού πεδίου και συλλέγονται από τον ανιχνευτή σε διαστήματα ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Το φασματόμετρο μαζών απεικονίζεται στο ακόλουθο σχήμα (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Φασματομέτρο μαζών. Σχηματική αναπαράσταση της εισαγωγής του δείγματος, της περιοχής ιονισμού, επιτάχυνση και διαχωρισμός των θραυσμάτων. [37]

Η παραγωγή ιόντων στο φασματομέτρο μαζών γίνεται με βομβαρδισμό του ατμού της ουσίας (που προηγουμένως έχει εξαερωθεί σε υψηλή θερμοκρασία) με ηλεκτρόνια. Ο ατμός που παράγεται με εξάτμιση περνάει στο θάλαμο παραγωγής ιόντων σε χαμηλή πίεση των 10^{-5} – 10^{-7} mm Hg και βομβαρδίζεται με ηλεκτρόνια ενέργειας 10-100 eV. Ενέργεια της τάξης των 10-15 eV ανταποκρίνεται στο **δυναμικό ιονισμού** των περισσότερων οργανικών ενώσεων και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία θετικών ιόντων με την αφαίρεση ενός τουλάχιστον ηλεκτρονίου από το οργανικό μόριο. Τα ιόντα που παράγονται καλούνται **μοριακά ιόντα**. Καθώς η ενέργεια των ηλεκτρονίων με τα οποία βομβαρδίζεται το δείγμα αυξάνεται και πέρα των 15 eV, τα μοριακά ιόντα υπόκεινται σε νέα διάσπαση παράγοντας **θραύσματα ιόντα** που είναι χαρακτηριστικά της μοριακής δομής της οργανικής ένωσης. Έχει βρεθεί ότι με ενέργεια ηλεκτρονίων περίπου 70 eV πραγματοποιείται συστηματική θραυσματοποίηση δεσμών του μορίου, που μπορεί να αναπαραχθεί σε σημαντικό βαθμό. Με ενέργειες ηλεκτρονίων άνω των 70 eV παρατηρείται σχηματισμός ολοένα και αυξανόμενου αριθμού διπλά φορτισμένων ιόντων, που οφείλεται στην αφαίρεση δύο ηλεκτρονίων από το μόριο ή το μοριακό ιόν του δείγματος [36],[37]

Τα θετικά ιόντα που σχηματίζονται με αυτό τον τρόπο αποβάλλονται από το χώρο ιονισμού εφαρμόζοντας ηλεκτροστατικό πεδίο με ειδικούς δίσκους που επιταχύνουν τα ιόντα μέσα από τις κεντρικές οπές προς τη σχισμή. Τα επιταχυνθέντα ιόντα εισέρχονται στο χώρο του μαγνητικού αναλυτή (πόλοι

ενός ισχυρού μαγνήτη) για τον τελικό διαχωρισμό τους ανάλογα με το μοριακό τους βάρος.

Το φασματομέτρο μαζών μπορεί να διαχωρίσει ιόντα σύμφωνα με το πηλίκο της μάζας/φορτίο και όχι μόνο ως προς τη μάζα τους. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι τα περισσότερα ιόντα που παράγονται κατά τη θραυσματοποίηση οργανικών ενώσεων στον φασματογράφο μαζών έχουν φορτίο 1⁺.

Η διαχωριστική ικανότητα του φασματομέτρου μαζών μετριέται από το ύψος της “κοιλιάδας” μεταξύ δύο κορυφών ίσης έντασης. Συνήθως η διαχωριστική ικανότητα θεωρείται ικανοποιητική όταν το ύψος της κοιλιάδας είναι μικρότερο του 10% των κορυφών. Η διαχωριστική ικανότητα ενός φασματομέτρου μαζών εξαρτάται από τρεις παράγοντες: (α) την ακτίνα που διαγράφουν οι τροχιές των ιόντων, (β) το εύρος των σχισμών στους επιταχυντές και το συλλέκτη και (γ) την ομοιομορφία της κινητικής ενέργειας των ιόντων με το ίδιο m/z , καθώς εισέρχονται στο χώρο του διαχωριστή.^[36]

3.4 Σύζευξη αεριοχρωματογράφου και φασματομέτρου μαζών

Το πιο σημαντικό πρόβλημα στη φασματομετρία μαζών ήταν μέχρι πρόσφατα η καθαρότητα του δείγματος. Ακόμη και ελάχιστες ποσότητες προσμίξεων ή παράγωγα της ένωσης, μπορούν να δώσουν πολλές ανεξήγητες φασματικές γραμμές που θα δυσκολέψουν την ερμηνεία του φάσματος. Εάν όμως το δείγμα περάσει μέσα από τη στήλη διαχωρισμού ενός αεριοχρωματογράφου τότε παραλαμβάνεται σε τελείως καθαρή κατάσταση (θα είναι ένα από τα κλάσματα της χρωματογράφησης). Οι ποσότητες (10-12 μέχρι 10⁻³ g) που εξέρχονται μετά τη χρωματογράφιση είναι στην αέρια φάση και σε ιδανικές συνθήκες για να περάσουν στο θάλαμο ιονισμού του αεριοχρωματογράφου, με την προϋπόθεση να απομακρυνθεί το φέρον αέριο (συνήθως ήλιο). Η απομάκρυνση του φέροντος αερίου γίνεται με φίλτρα (από συντηγμένο γυαλί) ή με μεμβράνες, ενώ η πιο συνηθισμένη μέθοδος είναι με την επίδραση του κενού. Το φέρον αέριο και το κλάσμα της οργανικής ένωσης διαβιβάζονται, μετά το διαχωρισμό τους από τον αεριοχρωματογράφο, σε ένα ακροφύσιο

διαχωρισμού. Με τον τρόπο αυτό, η οργανική ένωση (σε αέρια κατάσταση), που είναι πιο βαριά από το ήλιο, περνάει στο σύνολό της κατά μήκος του υψηλού κενού (μεταξύ των δύο ακροφυσίων) στο θάλαμο ιονισμού, ενώ το μικρού μοριακού βάρους αέριο διαχέεται πλαγίως, κάτω από την επίδραση του κενού.

Ο αεριοχρωματογράφος είναι άμεσα συνδεδεμένος με το Φασματοόμετρο Μάζας και το φάσμα μαζών κάθε μιας ουσίας στο μίγμα καταγράφεται καθώς εγκαταλείπει τη στήλη διαχωρισμού. Με τον τρόπο αυτό, γίνεται και η ανίχνευση μικρών ποσοτήτων προσμίξεων και η πιστοποίηση τους. Ως αναλυτική μέθοδος, η GC-MS, παρά τους περιορισμούς και τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει (απαιτείται ταχύτατη καταγραφή του φάσματος, ορισμένες αντιδράσεις ισομερισμού μέσα στη στήλη διαχωρισμού του αεριοχρωματογράφου περνούν απαρατήρητες, μικρές ποσότητες του φέροντος αερίου διαφεύγουν στο θάλαμο ιονισμού, κλπ) εφαρμόζεται με μεγάλη επιτυχία στην ανάλυση φαρμάκων, φυτοφαρμάκων, στεροειδών και μεταβολιτών στο αίμα και τα ούρα, τοξικών ουσιών στα τρόφιμα, τοξικών ουσιών στο πόσιμο νερό, κλπ. Η “ανάγνωση” του φάσματος και η σύγκριση του με φάσματα από μια συλλογή 30000-40000 φασμάτων σε τράπεζα πληροφοριών είναι πλέον εργασία απλή με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού υπολογιστή που φέρουν όλα τα νέα φασματοόμετρα μάζας.^{[36],[37]}

4. ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ

Στο κεφάλαιο αυτό θα γίνει σύντομη αναφορά στα χαρακτηριστικά του αίματος και στις βιοχημικές παραμέτρους που προσδιορίζονται συνήθως. Ορισμένες από τις παραμέτρους αυτές, είναι τα λευκά αιμοσφαίρια (WBCs) και τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs).

4.1 Γενικές πληροφορίες

Το αίμα αποτελεί τον υγρό ιστό του σώματος. Κατάγεται μαζί με τη λέμφο από το μεσέγχυμα και περιγράφεται ως το τέταρτο είδος του ερειστικού ιστού. Μέσω αυτού γίνεται η ανταλλαγή της ύλης και της ενέργειας, καθώς και μία σειρά σημαντικών λειτουργιών.

Είναι υγρό παχύρρευστο, με κολλώδη σύσταση, οσμή ιδιάζουσα και γεύση ελαφρώς αλμυρή. Η αντίδραση, ενεργός οξύτητα, του αίματος είναι ελαφρώς αλκαλική με pH 7,28 – 7,40. Το ειδικό βάρος του ανέρχεται σε 1,050 – 1,062 και το χρώμα του διαφέρει ανάλογα με την προέλευσή του. Πιο συγκεκριμένα το αρτηριακό αίμα είναι λαμπρό ερυθρό, λόγω της οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης (οξυαιμοσφαιρίνης) που υπάρχει στα ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ το φλεβικό αίμα είναι σκοτεινό ερυθρό προς κυανέρυθρο λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας σε οξυγόνο και αυξημένης ποσότητας διοξειδίου του άνθρακα.

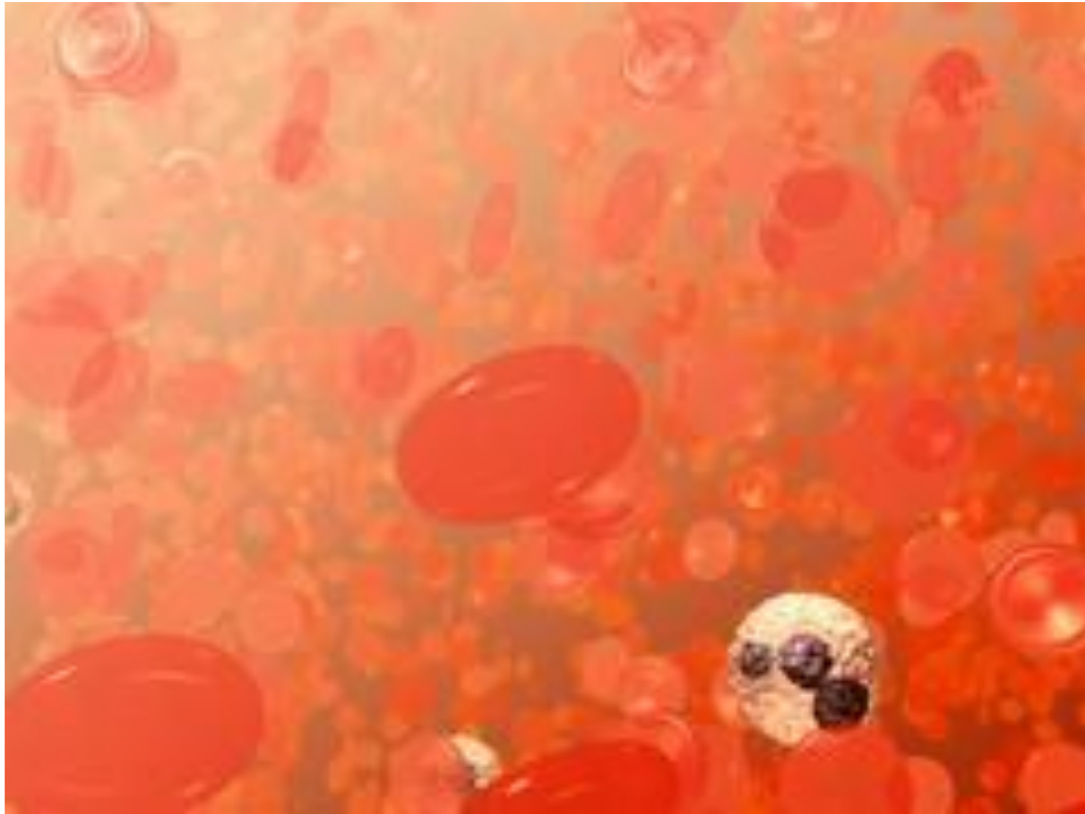
Από πλευράς φυσιολογίας, το βάρος του αίματος αντιστοιχεί περίπου στο 8% του συνολικού βάρους του σώματος και η ποσότητά του ανέρχεται περίπου στα 5 λίτρα. Η κίνησή του εντός του κυκλοφορικού συστήματος (καρδιά αιμοφόρα αγγεία) επιτυγχάνεται με την καρδιακή λειτουργία. Φυσιολογικά το αίμα δεν πήζει στην κυκλοφορία, εκτός αν υπάρχει κάποια παθολογική κατάσταση. Αντιθέτως πήζει όταν εξέλθει από τα αιμοφόρα αγγεία, γεγονός που δηλώνει ότι περιέχει ουσίες σε πρόδρομη κατάσταση, έτοιμες να δημιουργήσουν το πήγμα μόλις δοθεί το αντίστοιχο ερέθισμα.

Το αίμα, με τη βοήθεια των έμμορφων και άμορφων συστατικών του επιτελεί τις ακόλουθες λειτουργίες:

- Με τα ερυθρά αιμοσφαίρια που περιέχουν την αιμοσφαιρίνη επιτυγχάνεται η μεταφορά των αναπνευστικών αερίων, δηλαδή η μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες στα κύτταρα των ιστών και του διοξειδίου του άνθρακα από τους ιστούς στους πνεύμονες, από όπου αποβάλλεται (αναπνευστική λειτουργία).
- Με τα λευκά αιμοσφαίρια συμβάλλει στην άμυνα του οργανισμού εναντίον διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών και άλλων τοξικών ουσιών, με τις φαγοκυτταρικές ιδιότητες που διαθέτουν και τα αντισώματα που παράγουν (αμυντική λειτουργία).
- Με τα αιμοπετάλια και με ουσίες του πλάσματος συμμετέχει στην πήξη του αίματος (λειτουργία πήξεως).
- Με το πλάσμα μεταφέρει θρεπτικές ουσίες, προϊόντα της πέψης, που απορροφούνται από το γαστρεντερικό σωλήνα και παραλαμβάνει τα παράγωγα από τη διάσπασή τους για αποβολή από τα απεκκριτικά όργανα (θρεπτική λειτουργία).
- Επίσης μεταφέρει ορμόνες, βιταμίνες και ένζυμα από τα όργανα παραγωγής στα κύτταρα που προορίζονται (μεταφορική λειτουργία).
- Συμβάλλει στη διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας, μεταφέροντας νερό και όξινα προϊόντα μεταβολισμού στα απεκκριτικά όργανα, διατηρώντας έτσι το pH του αίματος σταθερό (οξεοβασική ισορροπία).
- Τέλος εξασφαλίζει την ισότιμη κατανομή της θερμότητας σε όλα τα όργανα και διατηρεί τη θερμοκρασία του οργανισμού στους 36,7°C (θερμορυθμιστική λειτουργία).^[39]

4.2 Ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs) ή ερυθροκύτταρα

Τα ερυθροκύτταρα έχουν χαρακτηριστικό σχήμα αμφίκοιλου δίσκου με διάμετρο 7-8 μm, είναι απύρνηνα και το κύριο συστατικό τους είναι η πρωτεΐνη αιμοσφαιρίνη, που τους προσδίδει το χαρακτηριστικό τους χρώμα (Εικόνα 4).^[40]



Εικόνα 4: Απεικόνιση ερυθρών αιμοσφαιρίων^[41]

Η σημαντικότερη λειτουργία των ερυθροκυττάρων είναι η μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς και CO_2 από τους ιστούς στους πνεύμονες.

Τα ερυθροκύτταρα προέρχονται από ένα κύτταρο γνωστό ως προερυθροβλάστη. Τα φυσιολογικά επίπεδα των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο αίμα είναι: $4,6 - 6,2 \text{ M } \mu\text{L}^{-1}$.^[40]

Αυξημένες τιμές τους μπορεί να οφείλονται σε:^[42]

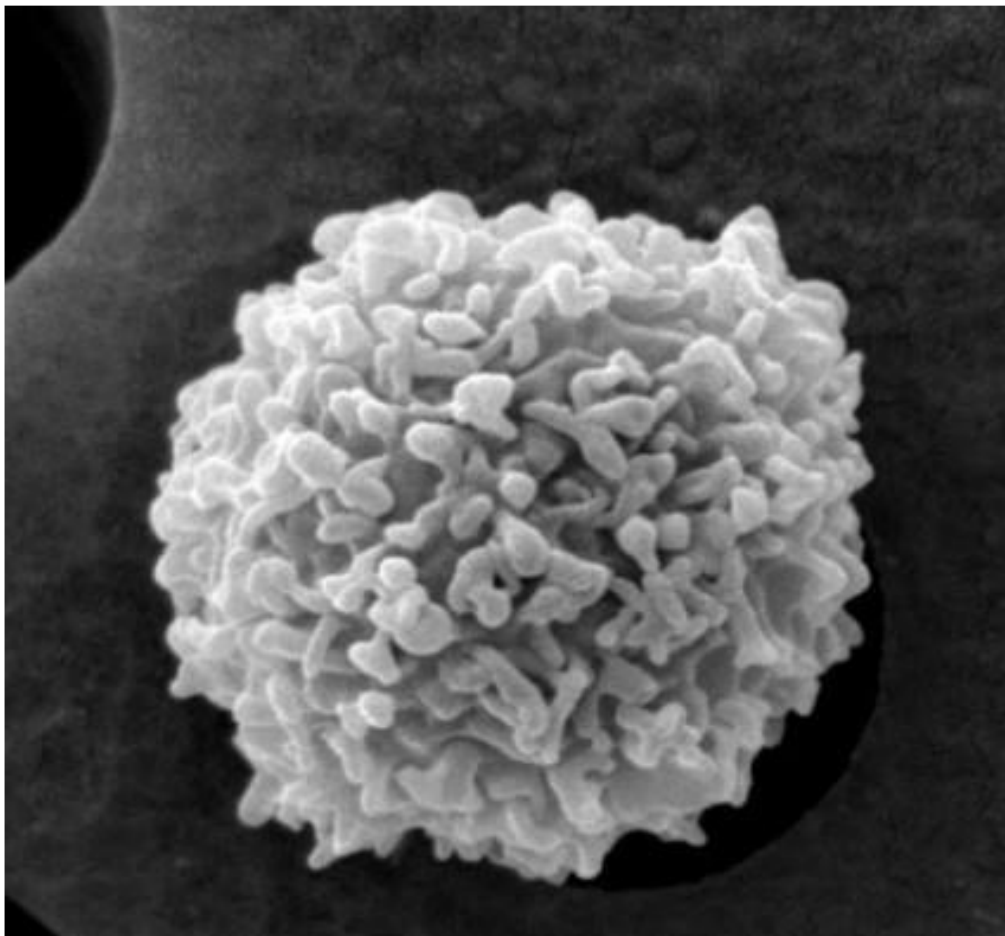
- Πρωτοπαθή ερυθροκυττάρωση (μυελοϋπερπλαστική διαταραχή).
- Δευτεροπαθή ερυθροκυττάρωση που μπορεί να οφείλεται σε νεφρική νόσο, καρδιαγγειακά νοσήματα, πνευμονική νόσο, μεγάλο υψόμετρο, κάπνισμα κ.α.
- Σχετική ερυθροκυττάρωση (μείωση όγκου του πλάσματος), που μπορεί να οφείλεται σε αφυδάτωση (έμετος ή διάρροια), άγχος, κατάχρηση διουρητικών κ.α.

Μειωμένος αριθμός ερυθροκυττάρων παρατηρείται σε περιπτώσεις όπως:^[43]

- Αναιμία
- Νόσο HODGKIN και άλλα λεμφώματα
- Πολλαπλό μύελωμα, μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα
- Λευχαιμία
- Ερυθρηματώδη λύκο
- Ρευματικό πυρετό κ.α.

4.3 Λευκά αιμοσφαίρια (WBCs) ή λευκοκύτταρα

Τα λευκοκύτταρα είναι εμπύρνηνα κύτταρα που συμμετέχουν στο σύστημα της ανοσίας. Διακρίνονται σε πολυμορφοπύρνηνα κοκκιοκύτταρα (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα), μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα. (Εικόνα 5)



Εικόνα 5: Απεικόνιση λευκού αιμοσφαιρίου^[44]

Τα φυσιολογικά επίπεδα των λευκών αιμοσφαιρίων στο αίμα είναι: 4,5-11,0 Κ μL⁻¹.

Αυξημένες τιμές τους μπορεί να οφείλονται σε: ^[42]

- Λοιμώξεις που προκαλούνται συνήθως από μικρόβια, ιούς, μύκητες ή παράσιτα
- Φλεγμονές ή φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα ή οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου
- Λευχαιμία ή μυελοπερπλαστικά σύνδρομα
- Νεκρωτικές καταστάσεις (τραύμα, εγκαύματα ή καρδιακή προσβολή)
- Αλλεργικές αντιδράσεις (αλλεργίες, άσθμα)
- Έντονη άσκηση
- Σωματική ή συναισθηματική καταπόνηση (stress)

Χαμηλός αριθμός λευκοκυττάρων (λευκοπενία) μπορεί να οφείλεται σε:

- Βλάβη του μυελού των οστών (πχ από τοξίνη, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, χρήση ναρκωτικών ουσιών)
- Διαταραχές κατά τις οποίες ο μυελός των οστών δεν παράγει επαρκή ποσότητα λευκών αιμοσφαιρίων (μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο, έλλειψη βιταμίνης B12 ή φυλλικού οξέος)
- Λέμφωμα ή μεταστάσεις κάποιου καρκίνου στον μυελό των οστών
- Αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο ερυθρηματώδης λύκος, στα οποία ο οργανισμός επιτίθεται και καταστρέφει τα δικά του λευκά αιμοσφαίρια
- Σήψη
- Ασθένειες του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως το AIDS, που καταστρέφουν τα Τ λεμφοκύτταρα

4.4 Πλάσμα και ορός αίματος

Το πλάσμα είναι ρευστή μεσοκυττάρια ουσία του αίματος μέσα στην οποία αιωρούνται τα έμμορφα συστατικά. Πρόκειται για υποκίτρινο υγρό που αποτελείται βασικά από νερό, στο οποίο βρίσκονται διαλυμένες διάφορες

ουσίες. Ο όγκος του πλάσματος σε ένα φυσιολογικό ενήλικα είναι περίπου τρία λίτρα, αποτελώντας το 55% του συνολικού όγκου του αίματος.

Εκτός από το νερό, τα κυριότερα συστατικά του πλάσματος ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες: τα οργανικά και τα ανόργανα συστατικά. Το νερό αποτελεί το 90% του πλάσματος και χρησιμεύει ως διαλύτης κρυσταλλικών ουσιών. Άλλες μεταφερόμενες ουσίες που υπάρχουν στο πλάσμα είναι τα προϊόντα μεταβολισμού (όπως γαλακτικό οξύ και πυροσταφυλικό οξύ), ορμόνες, βιταμίνες, ένζυμα, φάρμακα, αντισώματα και χρωστικές.

Στα οργανικά συστατικά του πλάσματος περιλαμβάνονται αζωτούχες και μη αζωτούχες ενώσεις. Στις αζωτούχες ενώσεις ανήκουν πρωτίστως οι πρωτεΐνες του πλάσματος σε ποσοστό 70%, η ουρία, το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη, η κρεατινίνη, τα ελεύθερα αμινοξέα κ.α. Οι μη αζωτούχες ενώσεις είναι το σάκχαρο, η χοληστερίνη, το γαλακτικό οξύ, τα λίπη κ.α.

Οι πρωτεΐνες που αποτελούν και το σπουδαιότερο από τα οργανικά συστατικά του πλάσματος διακρίνονται στις εξής κατηγορίες: λευκωματίνες, σφαιρίνες, ινωδογόνο και λιποπρωτεΐνες και η πιο διαδεδομένη τεχνική για το διαχωρισμό τους είναι η ηλεκτροφόρηση.

Τα ανόργανα συστατικά του πλάσματος είναι άλατα διαφόρων στοιχείων, κυρίως νατρίου (Na), καλίου (K), ασβεστίου (Ca), χλωρίου (Cl), μαγνησίου (Mg), καθώς και θειικά, φωσφορικά, διπτανθρακικά κ.α. Τα άλατα αυτά βρίσκονται σε μικρές ποσότητες και σε μεγάλη αραιώση στο πλάσμα. Τα περισσότερα από αυτά δίστανται πλήρως σε ιόντα. Εξαιρείται το ποσοστό των αλάτων ασβεστίου, που είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες. Η μέτρηση των ιόντων εκφράζεται κυρίως σε meq/L.

Το pH του πλάσματος καθορίζεται από τη συγκέντρωση ιόντων H^+ που υπάρχουν σε αυτό και παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας του οργανισμού. Η μέση τιμή του pH του πλάσματος είναι 7,4 με φυσιολογικό εύρος διακύμανσης από 7,34 έως 7,44. Οι ακραίες τιμές συμβατές με τη ζωή είναι 6,8 το ελάχιστο και 7,8 το μέγιστο, όμως ακόμα και μικρές μεταβολές του pH μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές διαταραχές της οξεοβασικής ισορροπίας.

Μετά την αιμοληψία το πλάσμα λαμβάνεται με φυγοκέντρηση (>1300g), ως άνω κίτρινη φάση, σε ειδικούς δοκιμαστικούς σωλήνες με αντιπηκτικό [συνήθως είναι το αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA), η ηπαρίνη ή το λίθιο] για την αποφυγή ενεργοποίησης του μηχανισμού πήξης του αίματος. Εάν το δείγμα αίματος συλλεχθεί σε δοκιμαστικούς σωλήνες χωρίς αντιπηκτικό και αφεθεί να πήξει, τότε η υδατική άνω φάση που λαμβάνεται με φυγοκέντρηση ονομάζεται ορός. Η κύρια διαφοροποίηση λοιπόν μεταξύ πλάσματος και ορού είναι ότι ο ορός στερείται ινωδογόνου, καθώς το ινωδογόνο μετατρέπεται σε ινώδες κατά την πήξη του αίματος, ως αποτέλεσμα της πρωτεολυτικής δράσης της θρομβίνης. Για τεχνικούς λόγους, πολλές βιοχημικές μετρήσεις εκτελούνται στον ορό, οι συγκεντρώσεις όμως των περισσοτέρων ουσιών είναι ίσες και στα δύο υγρά (ορό, πλάσμα).^{[39],[45]}

5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο κεφάλαιο αυτό θα γίνει αναφορά στις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό υδροκινόνης, κατεχόλης, μουκονικού οξέος, ιππουρικού οξέος, μανδελικού οξέος και ο-, m-, p- μεθυλ – ιππουρικού οξέος. Στη συνέχεια θα παρατεθούν και τα αποτελέσματα που λήφθηκαν, καθώς και τα συμπεράσματα που προέκυψαν από αυτά.

5.1 Αιμοληψία

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε από ειδικευμένο προσωπικό στο ΤΜΗΜΑ ΑΙΜΟΛΗΨΙΩΝ του ΓΝΑ ΛΑΪΚΟ, στους νοσηλευόμενους ασθενείς στην ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ του νοσοκομείου.

Για την αιμοληψία χρησιμοποιήθηκαν σύριγγες των 10 ή 20 mL και το ολικό αίμα μοιράστηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες.

5.2 Επεξεργασία δειγμάτων

Στο βιοχημικό εργαστήριο τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν, 30 min μετά τη λήψη, για 10 min στις 4500 στροφές min⁻¹, για τον διαχωρισμό του ορού από τα έμμορφα συστατικά. Κατόπιν ακολούθησε η ανάλυση του ορού σε αυτόματο βιοχημικό αναλυτή.

Στο αιματολογικό εργαστήριο η ανάλυση έγινε άμεσα σε αυτόματο αιματολογικό αναλυτή, χωρίς προκατεργασία.

5.3 Συντήρηση δειγμάτων

Μετά τη διαδικασία της ανάλυσης τα δείγματα συντηρήθηκαν σε καταψύκτη βαθιάς κατάψυξης στους -60°C για 15-20 ημέρες, πριν τη μεταφορά τους στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ, για την ανάλυση των μεταβολιτών των ΒΤΕΧ.

5.4 Παραγωγοποίηση

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στη διαδικασία της παραγωγοποίησης κατά την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων. Στις επόμενες παραγράφους θα αναφερθούν συνοπτικά οι μέθοδοι που έχουν ήδη αναπτυχθεί, καθώς και η αναγκαιότητα της παραγωγοποίησης.

5.4.1 Αναγκαιότητα παραγωγοποίησης

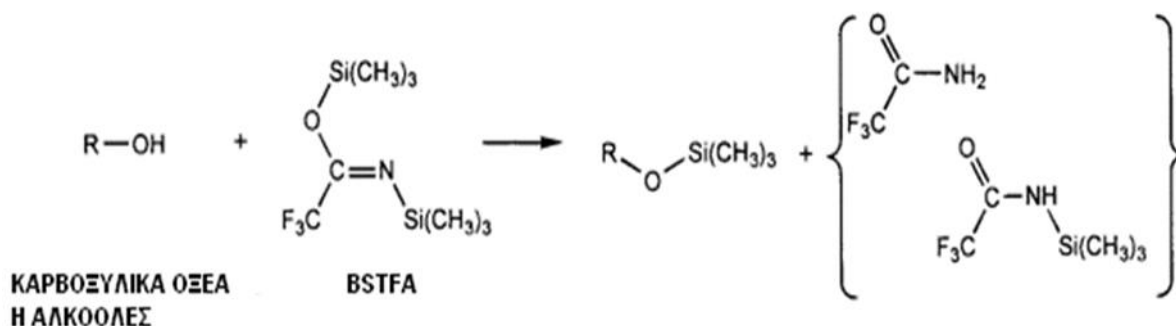
Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις (υδροκινόνη, κατεχόλη, μανδελικό οξύ, μουκονικό οξύ, ιππουρικό οξύ, ο-, m-, p- μεθυλ – ιππουρικό οξύ) περιέχουν χαρακτηριστικές ομάδες όπως καρβονύλιο (C=O) και καρβοξύλιο (-COOH) που αυξάνουν την πολικότητά τους. Η αεριοχρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS) έχει αποδειχθεί χρήσιμη για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση τους. Η τεχνική της παραγωγοποίησης αυξάνει την πτητικότητα, μειώνοντας ταυτόχρονα την πολικότητα των ενώσεων, γεγονός που διευκολύνει την ανάλυση μέσω του συστήματος GC-MS. Εξαιτίας λοιπόν των πολικών χαρακτηριστικών ομάδων που περιέχονται στη δομή των οξειδωμένων ενώσεων κρίνεται επιτακτική η ανάγκη παραγωγοποίησης τόσο για τα δείγματα όσο και για τα διαθέσιμα πρότυπα.^{[46],[47]}

Η τεχνική της παραγωγοποίησης είναι ιδιαίτερα χρήσιμη καθώς μπορεί να αυξήσει ή να μειώσει την πτητικότητα των αναλυτών, να βελτιώσει τον διαχωρισμό καθώς και την συμμετρία των κορυφών με παράλληλη μείωση των αντιδράσεων μεταξύ του δείγματος και της χρωματογραφικής στήλης, να αυξήσει την απόκριση του ανιχνευτή και τέλος να ενισχύσει τη θερμική σταθερότητα. Ένα καλό αντιδραστήριο παραγωγοποίησης δεν θα πρέπει να προκαλεί αναδιατάξεις στη δομή του αναλύτη, ούτε να παράγει κάποιο δραστικό υποπροϊόν. Αντίθετα θα πρέπει να παράγει ένα σταθερό παράγωγο το οποίο να είναι αδρανές ως προς τη χρωματογραφική στήλη και τις συνδέσεις του αέριο-χρωματογράφου, και τέλος, να δίνει μια αντίδραση της οποίας η απόδοση να είναι της τάξεως του 95 – 100% .^[48]

5.4.2 Παραγωγοποίηση ενός σταδίου

Έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές μέθοδοι ανάλογα με το πλήθος των ταυτοποιηθούν με σκοπό στον βέλτιστο χρόνο να έχουμε την μέγιστη δυνατή απόδοση.

Παραγωγοποίηση μονο-λειτουργικών ειδών με τμήματα -COOH, -C=O και -OH ή την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση ειδών με λειτουργίες -OH και -COOH έχει επιτευχθεί με μεθόδους ενός σταδίου. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται συχνότερα για να παραγωγοποιήσει σε ένα μόνο στάδιο τις υδρόξυ- και καρβοξυλο-ομάδες είναι το N,O-δισ(τριμεθυλοσιλυλ)-τριφθοροακεταμίδιο (BSTFA) με προσθήκη 1% ή 10% TMCS το οποίο δρα ως καταλύτης. Με αυτή τη διαδικασία, οι προαναφερθείσες ομάδες μετατρέπονται σε τριμεθυλο-σιλανοποιημένους εστέρες και αιθέρες αντίστοιχα.^{[49],[50],[51],[52],[53]}



Σχήμα 3: Παραγωγοποίηση ενός σταδίου με BSTFA

5.4.3 Παραγωγοποίηση πολλαπλών σταδίων

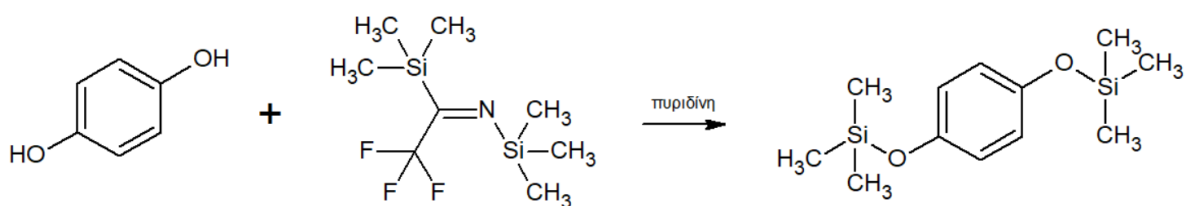
Οι δι- και πολυλειτουργικές ενώσεις τυπικώς παραγωγοποιούνται με μεθόδους δύο σταδίων. Σκοπός είναι η ολοκληρωμένη ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση πολυλειτουργικών, οξυγονωμένων οργανικών ειδών

αερολύματος, το οποίο έχει επιτευχθεί με τη χρήση διαφόρων μεθόδων παραγωγοποίησης. Οι μέθοδοι παραγωγοποίησης τριών σταδίων, επιτρέπουν τον σαφή προσδιορισμό των ενώσεων με χαρακτηριστικές ομάδες -COOH, -CO, -OH και εφαρμόζονται για τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση των μονο- και πολυλειτουργικών ενώσεων στο αερόλυμα.^{[54]-[60]}

Οι καρβονυλομάδες (-C=O) παραγωγοποιούνται στο πρώτο στάδιο της παραγωγοποίησης, οι καρβοξυλομάδες (-COOH) στο δεύτερο, ενώ οι υδροξυλομάδες -OH στο τρίτο στάδιο. Τα καρβονύλια μετατρέπονται σε παράγωγα οξίμης με υδροχλωρική O-(2,3,4,5,6-πενταφθοροβενζυλ) υδροξυλαμίνη (**PFBHA**)^[61] ή υδροχλωρική O-μεθυλυδροξυλαμίνη (**MHA**)^[62]. Η παραγωγοποίηση με PFBHA απαιτεί το εκχύλισμα διαλύτη του αερολύματος να μειωθεί σε ξηρότητα, το οποίο μπορεί να προάγει απώλειες πτητικών ειδών και η διάρκεια ολοκλήρωσης της αντίδρασης είναι 24 ώρες. Ωστόσο, το MHA μπορεί να προστεθεί στο εκχύλισμα αερολύματος και η παραγωγοποίηση είναι πλήρης σε περίπου 1 ώρα. Τα καρβοξυλικά οξέα συνήθως αλκυλιώνονται, ακυλιώνονται ή σιλυλιώνονται με μεθανόλη (MeOH) ή κ-βουτανόλη (η-BuOH) παρουσία ισχυρού οξέος Lewis όπως τριφθοριούχο βόριο (BF₃)^{[63],[64]-[67]}, διαζωμεθάνιο^{[68],[69]-[71]}, N,O-δισ(τριμεθυλσιλυλ) τριφθοροακεταμίδιο (BSTFA) ή N-μεθυλ-N-(τριμεθυλσιλυλ)τριφθοροακεταμίδιο (MSTFA)^[72]. Οι αλκοόλες συνήθως σιλυλιώνονται με μεθανόλη (MeOH) παρουσία ισχυρού οξέος Lewis όπως N,O-δισ(τριμεθυλσιλυλ) τριφθοροακεταμίδιο (BSTFA) ή N-μεθυλ-N-(τριμεθυλσιλυλ)τριφθοροακεταμίδιο (MSTFA).

5.4.4 Παραγωγή των μεταβολιτών BTEX

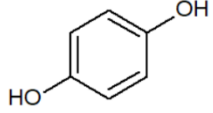
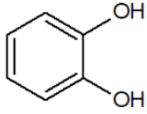
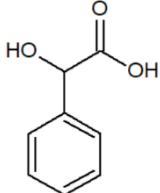
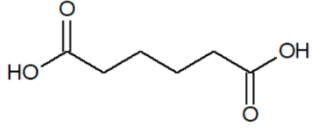
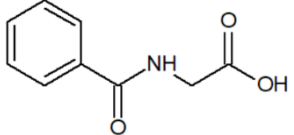
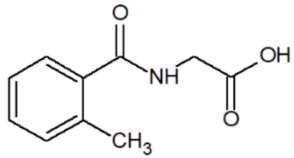
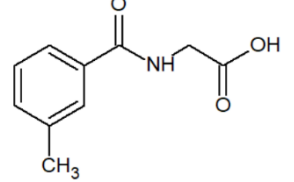
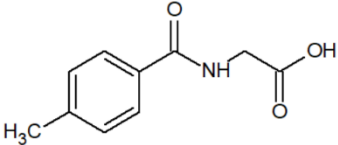
Κατά την πειραματική πορεία για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών των BTEX πραγματοποιήθηκε παραγωγή με BSTFA και πυριδίνη όπως στο παρακάτω σχήμα για την υδροκινόνη (Σχήμα 4).



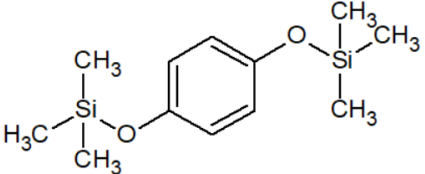
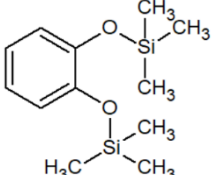
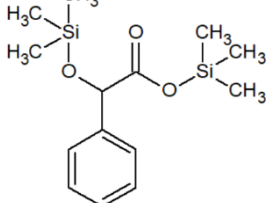
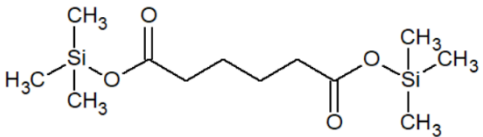
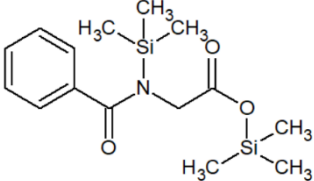
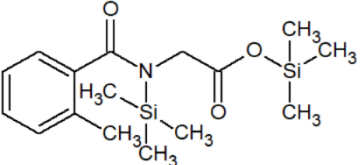
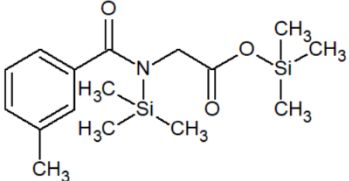
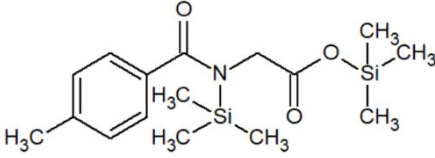
Σχήμα 4: Σχηματισμός παραγωγοποιημένου μορίου υδροκινόνης

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 1, Πίνακας 2) παρατίθενται οι μοριακές δομές των μεταβολιτών BTEX πριν και μετά την παραγωγή τους με BSTFA.

Πίνακας 1: Μοριακή δομή μεταβολιτών ΒΤΕΧ

Μεταβολίτης ΒΤΕΧ	Ένωση από την οποία προέρχεται	Μοριακός τύπος	Μοριακή δομή
Υδροκινόνη	Βενζόλιο	$C_6H_6O_2$	
Κατεχόλη	Βενζόλιο	$C_6H_6O_2$	
Μανδελικό Οξύ	Αιθυλοβενζόλιο	$C_8H_8O_3$	
Μουκονικό Οξύ	Βενζόλιο	$C_6H_6O_4$	
Ιππουρικό Οξύ	Τολουόλιο	$C_9H_9NO_3$	
2-Μεθυλ-ιππουρικό Οξύ	ο - Ξυλόλιο	$C_{10}H_{11}NO_3$	
3-Μεθυλ-ιππουρικό Οξύ	m - Ξυλόλιο	$C_{10}H_{11}NO_3$	
4-Μεθυλ-ιππουρικό Οξύ	p - Ξυλόλιο	$C_{10}H_{11}NO_3$	

Πίνακας 2: Μοριακή δομή παραγωγτοποιημένων μεταβολιτών ΒΤΕΧ

Μεταβολίτης ΒΤΕΧ	Παραγωγτοποιημένη μοριακή δομή
Υδροκινόνη	
Κατεχόλη	
Μανδελικό οξύ	
Μουκονικό οξύ	
Ιππουρικό οξύ	
2-Μεθυλ-ιππουρικό οξύ	
3-Μεθυλ-ιππουρικό οξύ	
4-Μεθυλ-ιππουρικό οξύ	

5.5 Εσωτερικό Πρότυπο

Η χρήση εσωτερικού προτύπου εφαρμόζεται στην περίπτωση που αναμένονται μεταβολές στην ευαισθησία της μετρητικής διάταξης από μέτρηση σε μέτρηση και σε μη απόλυτα επαναλαμβανόμενη επίδραση του υποστρώματος του δείγματος σε διαδικασίες της μεθόδου, όπως την εκχύλιση της ένωσης και άλλες κατεργασίες του δείγματος. Επίσης, εφαρμόζεται κυρίως στις χρωματογραφικές τεχνικές (GLC, HPLC) και στις ηλεκτροχημικές τεχνικές (πολαρογραφία, αναδιαλυτική βολταμμετρία) στις οποίες είναι δυνατή η σύγχρονη μέτρηση σημάτων περισσότερων του ενός συστατικού.

Στα πρότυπα και στα άγνωστα προστίθεται αυστηρά ίδια συγκέντρωση μιας ουσίας (εσωτερικό πρότυπο, internal standard, IS) (το οποίο δεν προϋπάρχει στο δείγμα) με την ίδια αναλυτική συμπεριφορά με το συστατικό που προσδιορίζεται. Η συγκέντρωσή του επιλέγεται έτσι, ώστε το σήμα του να είναι παρόμοιου μεγέθους με τα αναμενόμενα άγνωστα. Το ιδανικό εσωτερικό πρότυπο πρέπει να παρουσιάζει παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τις ενώσεις που προσδιορίζονται και η μέθοδος να αποκρίνεται κατά τον ίδιο τρόπο με τον αναλύτη, αλλά να μπορεί να μετράται εκλεκτικά. Στην περίπτωση ύπαρξης σταδίου κατεργασίας του δείγματος (π.χ. εκχύλισης) το εσωτερικό πρότυπο πρέπει να δείχνει συμπεριφορά παρόμοια με την προσδιοριζόμενη ένωση.^[73]

Τα παραπάνω κριτήρια πληροί η N – Benzoyl – DL – Alanine, γι' αυτό και χρησιμοποιήθηκε κατά τον προσδιορισμό των μεταβολιτών των BTEX ως εσωτερικό πρότυπο.

5.6 Προσδιορισμός των μεταβολιτών ΒΤΕΧ

5.6.1 Γενικά

Η μέθοδος χωρίζεται στις: α) δειγματοληψία και β) ανάλυση στο εργαστήριο.

Οι μελετούμενες ενώσεις εκχυλίζονται χρησιμοποιώντας κάποιον οργανικό διαλύτη. Το οργανικό εκχύλισμα καθαρίζεται μέσω στήλης χρωματογραφίας και στη συνέχεια συμπυκνώνεται.

Το τελικό δείγμα εγχέεται στον αεριοχρωματογράφο συζευγμένο με φασματόμετρο μαζών (GC/MS), οπότε οι μεταβολίτες των ΒΤΕΧ ανιχνεύονται μέσω φασματομέτρου μάζας και ο ιοντισμός των ενώσεων αυτών γίνεται με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Impact, EI). Οι αναλύτες ταυτοποιούνται μέσω των χρόνων ανάσχεσης και των κυρίων ιόντων τους και ποσοτικοποιούνται μέσω των εμβαδών τους.

Στον Πίνακα 3 παρατίθενται οι μελετούμενες ενώσεις κατά την σειρά έκλουσής τους, οι συντομογραφίες τους, καθώς και τα κύρια ιόντα τους.

Πίνακας 3: Οι μελετώμενοι μεταβολίτες ΒΤΕΧ κατά σειρά έκλυσης

A/A	Μεταβολίτες ΒΤΕΧ	Κύρια Ιόντα
1	Κατεχόλη	73,1 – 254,1 – 239,1
2	Υδροκινόνη	239,1 – 254,1 – 73,1
3	Μανδελικό Οξύ	179,1 – 73,1 – 147,1
4	Μουκονικό Οξύ	271,1 – 73,1 – 147,1
5	Ιππουρικό Οξύ	105,1 – 206,1
6	2 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	119,1 – 91,1 – 118,1
7	3 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	119,1 – 220,1 – 91,1
8	4 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	119,1 – 220,1 – 91,1

5.6.2 Οργανολογία

Κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα όργανα και εξοπλισμός:

Για την κατεργασία και ανάλυση των δειγμάτων:

- Ποτήρια ζέσεως των 100mL (Glass A).
- Λουτρό υπερήχων (Elma, Ultrasonic LC 130 H, 35 kHz).
- Εργαστηριακός Ζυγός (κλειστός) τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. (Galaxy, Ohaus). Ο ζυγός διακριβώνεται ετήσια με πρότυπα βάρη στην περιοχή ζύγισης 110g – 0,1mg.
- Περιστροφικός εξατμιστήρας (Buchi).
- Αναλυτικός εξατμιστήρας με έξι ακροφύσια και ρυθμιστή της ροής αζώτου (Supelco).
- Στήλες καθαρισμού μήκους 20 cm, εσωτερικής διαμέτρου 7mm και υποδοχέα χωρητικότητας 50 mL (Supelco).
- Υάλινα φιαλίδια με septa και βιδωτό πώμα των 1,8 mL (Agilent) κατάλληλο για τον αυτόματο δειγματολήπτη του χρωματογραφικού συστήματος.
- Υάλινα φιαλίδια με καπάκι των 15 mL (Supelco).
- Υάλινες σύριγγες των 10, 100 και 500 μ L (Hamilton).
- Πυριαντήριο για την ενεργοποίηση του υλικού πλήρωσης (silica gel) των χρωματογραφικών στηλών (Memmert, Germany) και παραγωγοποίηση των δειγμάτων.
- Αεροχρωματογραφικό σύστημα της Agilent 6890N GC με τριχοειδή στήλη HP-5, 30 μέτρων, συζευγμένο με φασματομέτρο μάζας GC/MSD σειράς 5975B με πηγή ιοντισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (Electron Ionization mode, EI) για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών. Διαθέτει και αυτόματο δειγματολήπτη με 8 θέσεις δειγμάτων της Agilent 7683B.

- Πιπέτες 5 mL και 1 mL (Eppendorf).
- Φιαλίδια των 15 mL (Falcon).
- Φυγοκεντρικοί σωλήνες με πάτο (Starsted).
- Ψαλίδι.
- Σπάτουλα.
- Λαβίδα.

5.6.3 Αντιδραστήρια

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν :

- Πρότυπο διάλυμα 8 μεταβολιτών των BTEX συγκέντρωσης $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Supelco).
- BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, για GC παραγωγοποίηση 99,0% (Fluka).

Διαλύτες:

- Ακετόνη, αναλυτικής καθαρότητας $\geq 99,5\%$ (G.T. Baker)
- Διχλωρομεθάνιο, καθαρότητας GC $\geq 99,8\%$ (Carlo Erba Reagents)
- Εξάνιο, καθαρότητας GC $\geq 99\%$ (Macron Fine Chemicals)
- Μεθανόλη, καθαρότητας HPLC (Macron Fine Chemicals).

Προσροφητικά – Πληρωτικά υλικά:

- Οξειδίο του πυριτίου (SiO_2) (silica gel 60) (Sigma Aldrich).
- Άνυδρο θειικό νάτριο, καθαρότητας $> 99,5\%$ (Panreac).
- Υαλοβάμβακας, (Supelco).

5.6.4 Αρχή της μεθόδου

Τα δείγματα ορού (1 mL) εισάγονται σε φιαλίδια των 30 mL, προστίθενται 10 mL μίγματος εσωτερικού προτύπου (N – Benzoyl – DL – Alanine) και εκχυλίζονται τρεις φορές σε λουτρό υπερήχων με 10 mL διχλωρομεθάνιο κάθε φορά. Το εκχύλισμα μεταφέρεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα, συμπυκνώνεται έως 4 mL, γίνεται αλλαγή διαλύτη σε εξάνιο και ακολουθεί τελική συμπύκνωση περίπου στα 2 - 3 mL.

Μετά τη συμπύκνωση ακολουθεί ο καθαρισμός του δείγματος μέσω της χρωματογραφικής στήλης, η οποία είναι πακεταρισμένη με 1g ενεργοποιημένου οξειδίου του πυριτίου και 1g θειικού νατρίου. Πριν τη χρήση, το οξείδιο του πυριτίου ξηραίνεται σε φούρνο στους 180°C για 24 h.

Αρχικά, ενεργοποιείται η στήλη με την προσθήκη 10 mL εξανίου. Το έκλουσμα αυτό απορρίπτεται. Όταν η επιφάνεια του εξανίου προσεγγίζει την επιφάνεια του θειικού νατρίου τότε εισάγεται στη στήλη το δείγμα. Η σειρά έκλουσης έχει ως εξής: αρχικά διέρχονται από τη στήλη 10 mL εξανίου και 10 mL μίγματος διχλωρομεθανίου – εξανίου (60:40), τα έκλουσματα που παραλαμβάνονται χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση άλλων προσδιοριζόμενων οργανικών ρύπων. Κατόπιν διαβιβάζονται 10 mL μεθανόλης και το έκλουσμα μεταφέρεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα, συμπυκνώνεται έως 2 - 3 mL και στη συνέχεια αυτό συμπυκνώνεται με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού. Στο δείγμα προστίθεται 250 μL BSTFA, 100 μL διχλωρομεθάνιο και 50 μL πυριδίνη και θερμαίνεται στο πυριαντήριο σε θερμοκρασία 70°C για 3 ώρες. Μετά την παραγωγοποίηση το δείγμα είναι έτοιμο για αεριοχρωματογραφικό προσδιορισμό.

5.6.5 Σχολιασμός πορείας κατεργασίας

Η εκχύλιση των μεταβολιτών των BTEX γίνεται με λουτρό υπερήχων αντί της συσκευής Soxhlet, διότι η μέθοδος αυτή μειώνει κατά πολύ τη χρονική διάρκεια εκχύλισης και συνάμα δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Επιπλέον η συμπύκνωση λαμβάνει χώρα με σκοπό την αύξηση της προσυγκέντρωσης λόγω χαμηλών συγκεντρώσεων στα δείγματα.

Στη συνέχεια το οξείδιο του πυριτίου (silica) χρησιμοποιείται ως προσροφητικό υλικό ενώ το άνυδρο θειικό νάτριο για την απορρόφηση της υγρασίας.

Γενικά, κατά τη διάρκεια όλης της προκατεργασίας του δείγματος, καλό είναι να αποφεύγεται όσο γίνεται, η έκθεση των δειγμάτων στο φως. Έτσι κάθε φορά που χρησιμοποιείται κάποια συσκευή ή κάποιο φιαλίδιο πρέπει να αποκλείεται το φως με φύλλα αλουμινίου.

Το μεθανολικό κλάσμα των δειγμάτων παραγωγοποιείται με BSTFA για να μετατραπούν οι πολικοί μεταβολίτες των BTEX σε λιγότερο πολικές ενώσεις, με αυτό το τρόπο επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός των ενώσεων και προστασία της χρωματογραφικής στήλης.

Η θερμοκρασία που επιτυγχάνεται η παραγωγοποίηση των μεταβολιτών BTEX πρέπει να είναι σταθερή στους 70°C.

5.6.6 Αεριοχρωματογραφική ανάλυση

Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με το αεριοχρωματογραφικό σύστημα 6890N της Agilent. Η χρωματογραφική στήλη είναι HP-5MS [(5%-Phenyl)-methylpolysiloxane], μη πολική, ενώ ο προσδιορισμός των μεταβολιτών που μας ενδιαφέρουν έγινε με φασματόμετρο μαζών 5975B της ίδιας εταιρείας. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται οι συνθήκες λειτουργίας του αεριοχρωματογραφικού συστήματος καθώς και του φασματομέτρου μάζας για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών των BTEX.

Πίνακας 4: Συνθήκες λειτουργίας αεριοχρωματογραφικού συστήματος για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών BTEX.

Χρωματογραφική στήλη:	HP-5MS
Θερμοκρασία εισαγωγέα:	280 °C
Θερμοκρασιακό πρόγραμμα:	Αρχική θερμοκρασία: 65°C για 1,00 min , Ramp 15 °C/min
	Τελική θερμοκρασία: 320 °C για 3,00 min
Φέρον αέριο:	Ήλιο, με ροή 1,8 ml/min
Όγκος δείγματος που ενίεται:	1,0 µL
Ανιχνευτής:	Φασματόμετρο Μάζας
Πηγή ιοντισμού:	EI (Electron Ionization)
Θερμοκρασία πηγής ιοντισμού MS:	230 °C

Συγκεκριμένα για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών BTEX χρησιμοποιείται αεριοχρωματογραφικό σύστημα συζευγμένο με φασματόμετρο μαζών, όπου ο ιοντισμός των διαχωριζόμενων ενώσεων γίνεται με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (EI, Electron Impact ionization).

5.6.7 Διασφάλιση ποιότητας χημικών δοκιμών

5.6.7.1 Γενικά

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι μετρήσεις μιας φυσικής ή χημικής ποσότητας υπόκεινται σε σφάλματα, τα οποία προσδίδουν στο αποτέλεσμα μια αβεβαιότητα. Αυτή η αβεβαιότητα μπορεί να εκτιμηθεί, να ελαχιστοποιηθεί, αλλά ποτέ δεν μπορεί να αρθεί. Συνεπώς για τη διασφάλιση της ποιότητας και την αξιολόγηση της ακολουθούμενης αναλυτικής μεθόδου, απαιτείται η διεξαγωγή σχετικών πειραμάτων.

Η διασφάλιση της ποιότητας των χημικών μετρήσεων αφορά τη διασφάλιση ποιότητας όλων των σταδίων της πορείας προσδιορισμού.

Τα χαρακτηριστικά που θα εξεταστούν και θα παρουσιαστούν στη συνέχεια του κεφαλαίου είναι τα εξής:

- η ειδικότητα
- η γραμμικότητα
- οι ανακτήσεις των ενώσεων
- η ακρίβεια
- η πιστότητα (επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα)
- το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των μεταβολιτών με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο.

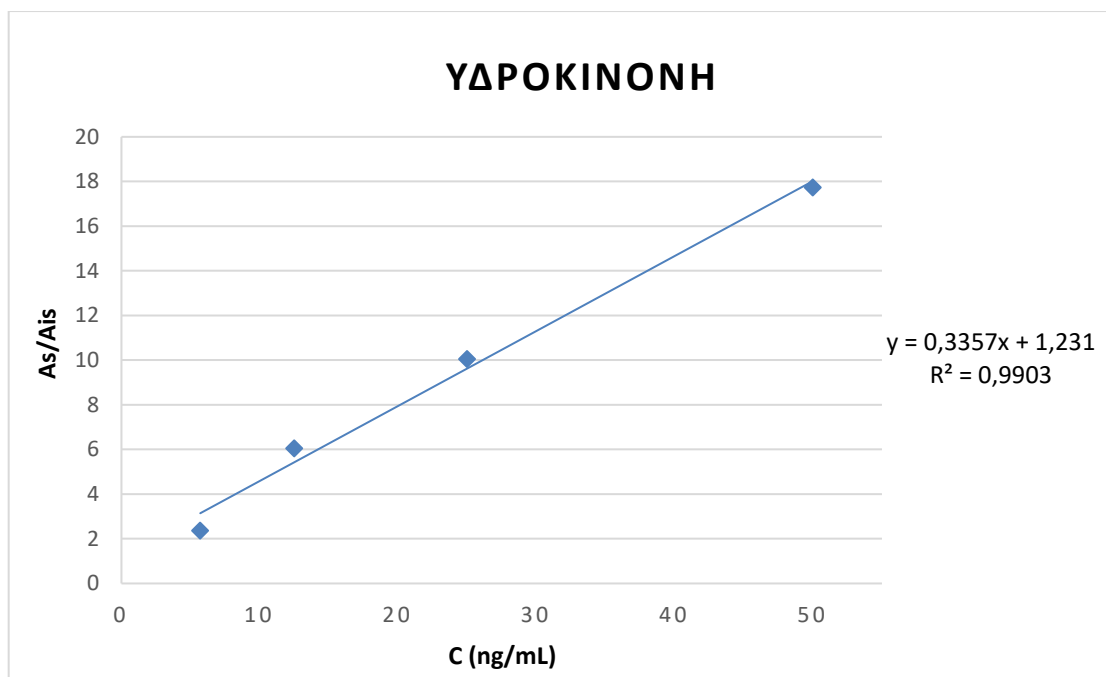
5.6.7.2 Ειδικότητα και γραμμικότητα

Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές για πιθανές παρεμποδίσεις κατά τον προσδιορισμό των 8 μεταβολιτών των BTEX. Ακόμη, το χρωματογράφημα του λευκού δείγματος (blank sample), έδειξε ότι η μήτρα δεν προκαλεί παρεμποδίσεις στους αναλύτες. Έτσι κρίνεται ικανοποιητική η ειδικότητα της μεθόδου.

Η αναλυτική μέθοδος πρέπει να παρουσιάζει γραμμικότητα μεταξύ του λόγου του αναλυτικού σήματος του αναλύτη με αυτόν του εσωτερικού προτύπου και της συγκέντρωσης των αναλυτών σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων στο οποίο εφαρμόζεται. Ο προσδιορισμός των εξισώσεων βαθμονόμησης σε πρότυπα διαλύματα των οκτώ μεταβολιτών των BTEX πραγματοποιήθηκε με απευθείας ένεση στο χρωματογράφο συγκεντρώσεων 5,7, 12,5, 25,0 και 50,0 ng mL⁻¹. Για κάθε πρότυπο διάλυμα του μίγματος των ενώσεων ελήφθησαν τρία (3) χρωματογραφήματα. Οι καμπύλες βαθμονόμησης των μεταβολιτών BTEX κατασκευάστηκαν με τη χρήση εσωτερικού προτύπου. Από τα αποτελέσματα προκύπτει πως όλες οι εξισώσεις των καμπύλων βαθμονόμησης, έχουν συντελεστές συσχέτισης (r) πολύ κοντά στο 1. Αυτό υποδηλώνει την πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ της κάθε μετρούμενης παραμέτρου και της συγκέντρωσης του κάθε αναλύτη των μεταβολιτών στο πρότυπο διάλυμα. Στη συνέχεια, στα σχήματα 5 – 12 παρουσιάζονται οι καμπύλες βαθμονόμησης των προσδιοριζόμενων μεταβολιτών, καθώς και οι πίνακες με τα αποτελέσματα που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους.

Πίνακας 5: Λόγος αποκρίσεων (Σήμα αναλύτη/ Σήμα εσωτερικού προτύπου) προτύπων διαλυμάτων 5,7, 12,5, 25 και 50 ng/mL της Υδροκινόνης.

C (ng/mL)	A/Ais
5,7	2,36969109
12,5	6,05683867
25	10,05312906
50	17,7333827



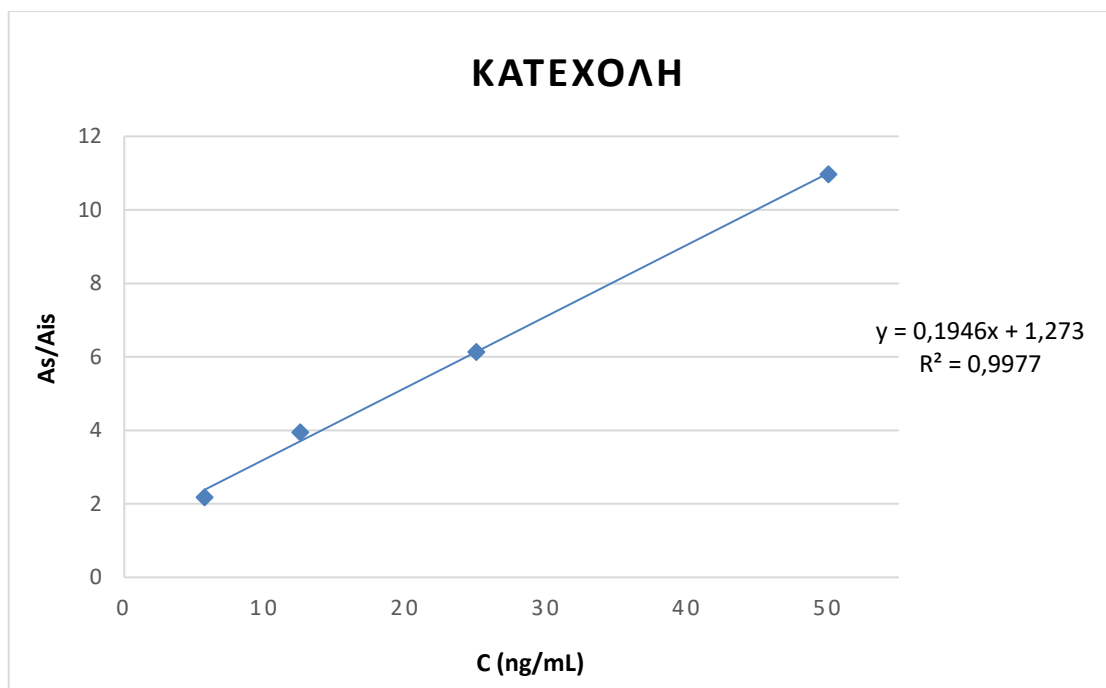
Σχήμα 5: Καμπύλη βαθμονόμησης για την Υδροκινόνη (n=3)

Η εξίσωση που προκύπτει για την καμπύλη βαθμονόμησης είναι η

$$y = 0,3357x + 1,231$$

Πίνακας 6: Λόγος αποκρίσεων (Σήμα αναλύτη/ Σήμα εσωτερικού προτύπου) προτύπων διαλυμάτων 5,7, 12,5, 25 και 50 ng/mL της Κατεχόλης.

C (ng/mL)	A/Ais
5,7	2,180362741
12,5	3,948367419
25	6,128928355
50	10,96676223



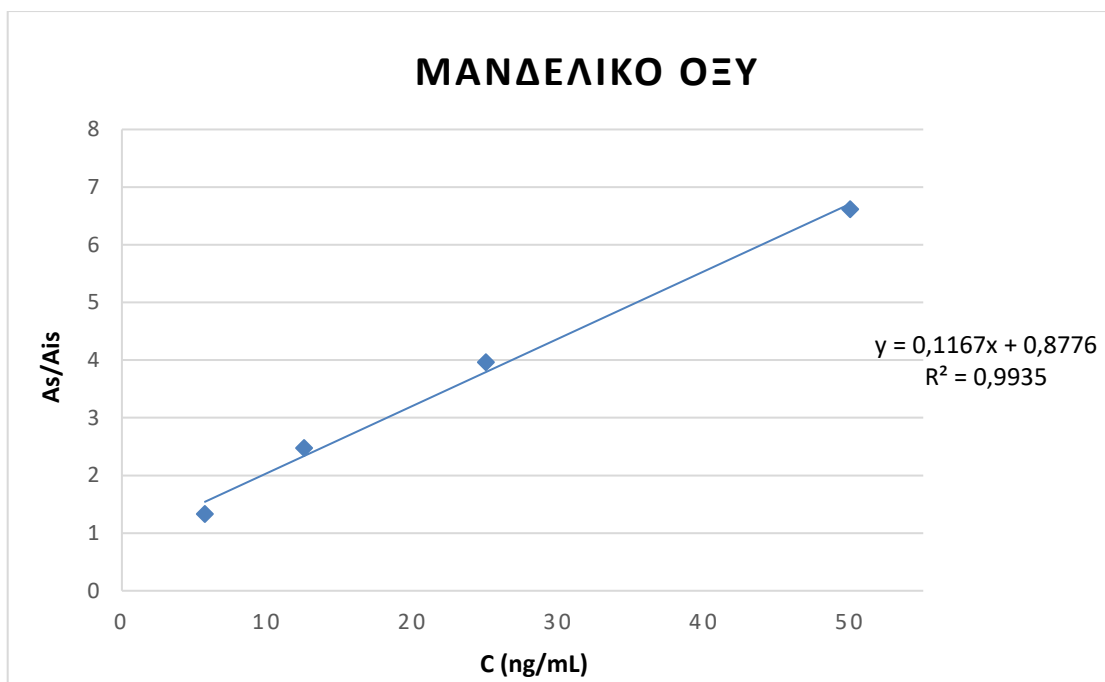
Σχήμα 6: Καμπύλη βαθμονόμησης για την Κατεχόλη (n=3)

Η εξίσωση που προκύπτει για την καμπύλη βαθμονόμησης είναι η

$$y = 0,1946x + 1,273$$

Πίνακας 7: Λόγος αποκρίσεων (Σήμα αναλύτη/ Σήμα εσωτερικού προτύπου) προτύπων διαλυμάτων 5,7, 12,5, 25 και 50 ng/mL του Μανδελικού Οξέος.

C (ng/mL)	A/Ais
5,7	1,331267125
12,5	2,472580621
25	3,964550788
50	6,616610622



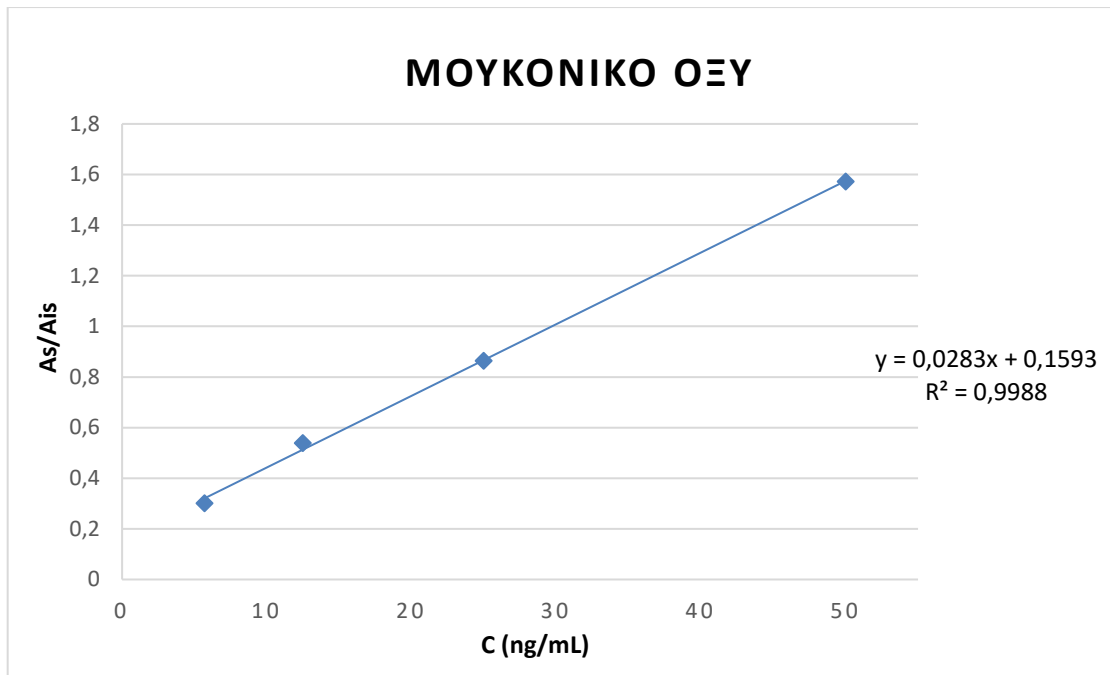
Σχήμα 7: Καμπύλη Βαθμονόμησης για το Μανδελικό οξύ (n=3)

Η εξίσωση που προκύπτει για την καμπύλη βαθμονόμησης είναι η

$$y = 0,1167x + 0,8776$$

Πίνακας 8: Λόγος αποκρίσεων (Σήμα αναλύτη/ Σήμα εσωτερικού προτύπου) προτύπων διαλυμάτων 5,7, 12,5, 25 και 50 ng/mL του Μουκονικού Οξέος.

C (ng/mL)	A/Ais
5,7	0,300632427
12,5	0,539285304
25	0,863529921
50	1,57241731



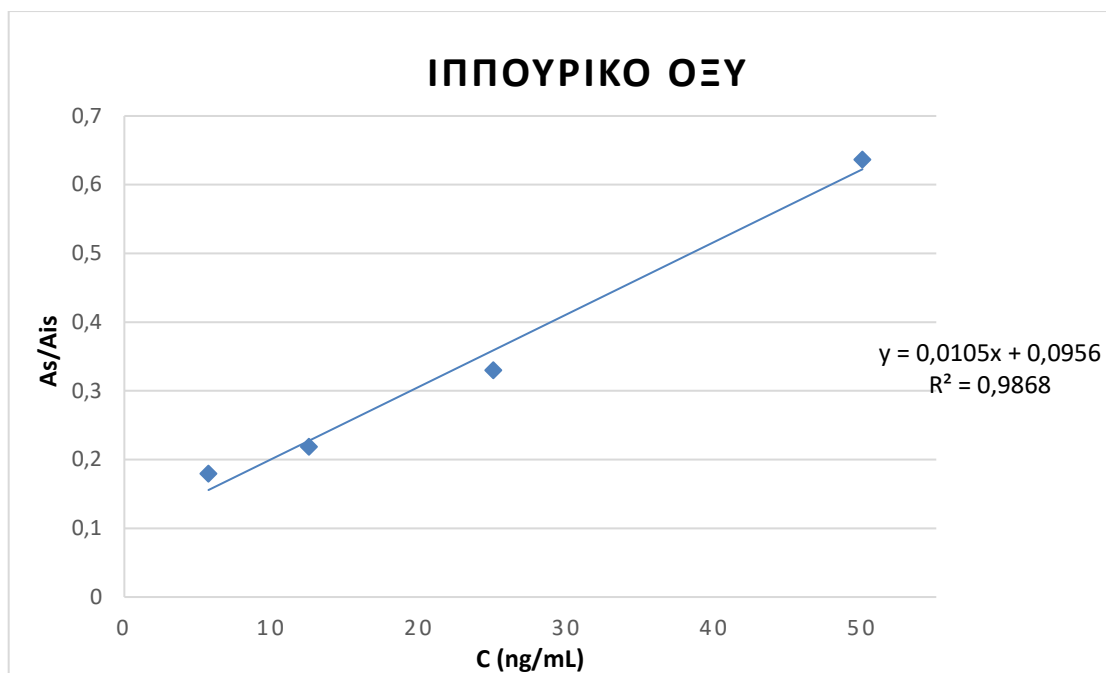
Σχήμα 8: Καμπύλη βαθμονόμησης για το Μουκονικό Οξύ (n=3)

Η εξίσωση που προκύπτει για την καμπύλη βαθμονόμησης είναι η

$$y = 0,0283x + 0,1593$$

Πίνακας 9: Λόγος αποκρίσεων (Σήμα αναλύτη/ Σήμα εσωτερικού προτύπου) προτύπων διαλυμάτων 5,7, 12,5, 25 και 50 ng/mL του Ιππουρικού Οξέος.

C (ng/mL)	A/Ais
5,7	0,17956
12,5	0,218634
25	0,32977
50	0,636549



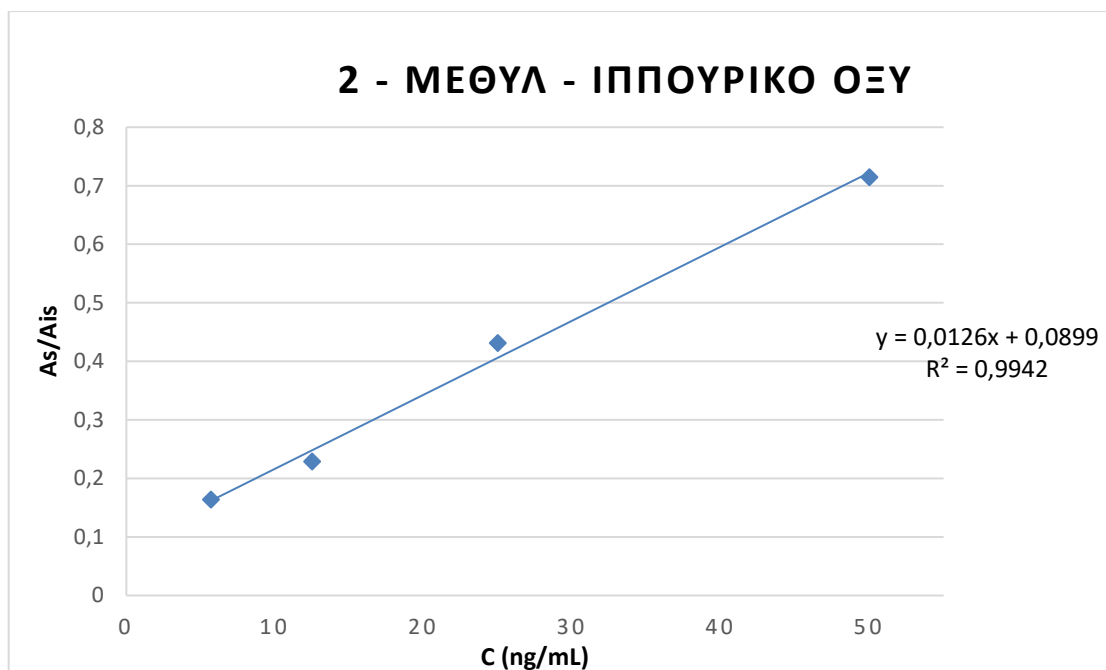
Σχήμα 9: Καμπύλη βαθμονόμησης για το ιππουρικό οξύ (n=3)

Η εξίσωση που προκύπτει για την καμπύλη βαθμονόμησης είναι η

$$y = 0,0105x + 0,0956$$

Πίνακας 10: Λόγος αποκρίσεων (Σήμα αναλύτη/ Σήμα εσωτερικού προτύπου) προτύπων διαλυμάτων 5,7, 12,5, 25 και 50 ng/mL του 2 – Μεθυλ – ιππουρικού Οξέος.

C (ng/mL)	A/Ais
5,7	0,164074843
12,5	0,228950845
25	0,431189888
50	0,71438202



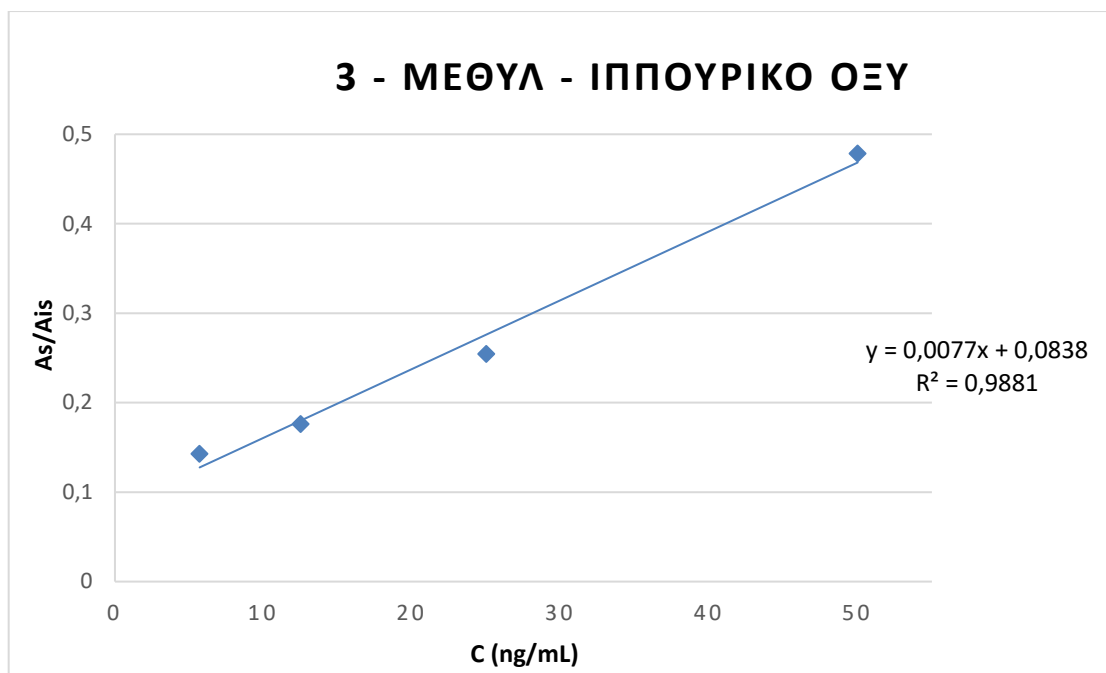
Σχήμα 10: Καμπύλη βαθμονόμησης για το 2 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ (n=3)

Η εξίσωση που προκύπτει για την καμπύλη βαθμονόμησης είναι η

$$y = 0,0126x + 0,0899$$

Πίνακας 11: Λόγος αποκρίσεων (Σήμα αναλύτη/ Σήμα εσωτερικού προτύπου) προτύπων διαλυμάτων 5,7, 12,5, 25 και 50 ng/mL του 3 – Μεθυλ – ιππουρικού Οξέος.

C (ng/mL)	A/Ais
5,7	0,142875397
12,5	0,176266215
25	0,254465706
50	0,478352797



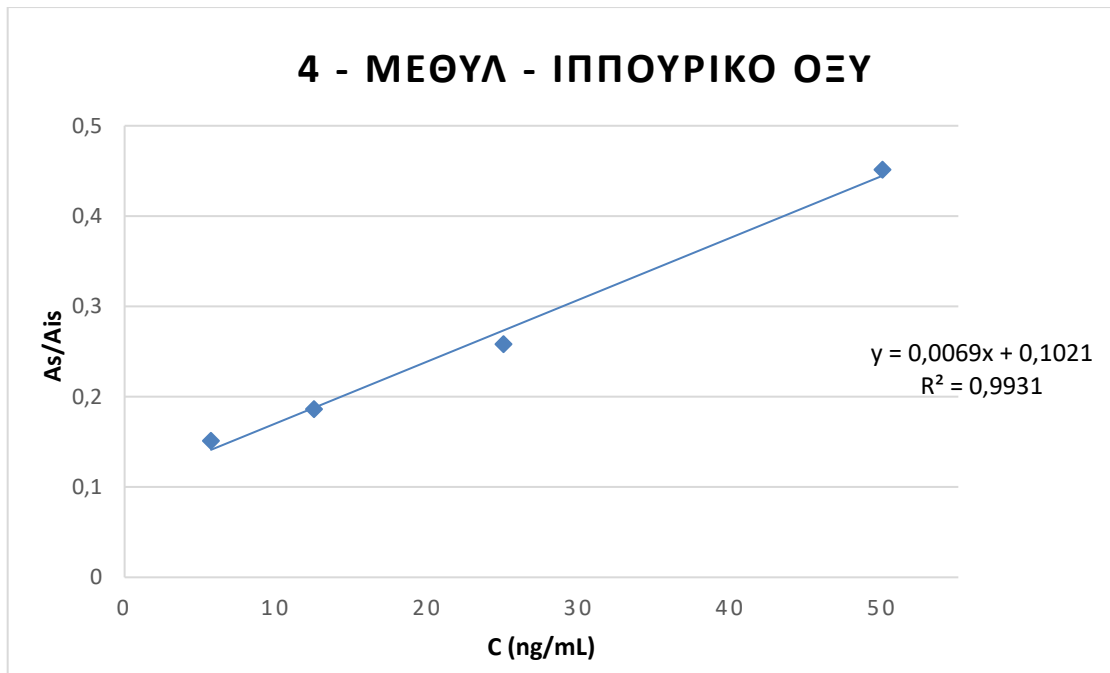
Σχήμα 11: Καμπύλη βαθμονόμησης για το 3 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ (n=3)

Η εξίσωση που προκύπτει για την καμπύλη βαθμονόμησης είναι η

$$y = 0,0077x + 0,0838$$

Πίνακας 12: Λόγος αποκρίσεων (Σήμα αναλύτη/ Σήμα εσωτερικού προτύπου) προτύπων διαλυμάτων 1,4, 5,7, 12,5, 25 και 50 ng/mL του 4 – Μεθυλ – ιππουρικού Οξέος.

C (ng/mL)	A/Ais
5,7	0,150957371
12,5	0,186313518
25	0,258293175
50	0,45147149



Σχήμα 12: Καμπύλη βαθμονόμησης για το 4 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ (n=3)

Η εξίσωση που προκύπτει για την καμπύλη βαθμονόμησης είναι η

$$y = 0,0069x + 0,1021$$

Όπως φαίνεται στα σχήματα παραπάνω οι καμπύλες βαθμονόμησης έχουν συντελεστές συσχέτισης (r) πολύ κοντά στο 1 άρα η γραμμικότητα κρίνεται ικανοποιητική.

5.6.7.3 Επαναληψιμότητα της μεθόδου

Για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου, ελέγχθηκε πρώτα η επαναληψιμότητα ως προς τους χρόνους ανάσχεσης με πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 25 ng/ mL και στη συνέχεια ως προς το εμβαδό των κορυφών σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης 5,7 και 50 ng/mL.

Στους ακόλουθους πίνακες (Πίνακες 13,14) παρουσιάζονται οι χρόνοι ανάσχεσης και η σχετική τυπική απόκλισή τους για τα πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 25 ng/mL, καθώς και το εμβαδό και η σχετική τυπική απόκλιση για τα πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 5,7 και 50 ng/mL.

Πίνακας 13: Μέση τιμή των χρόνων ανάλυσης (t_R) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD(%)) του μίγματος των μεταβολιτών από τα πρότυπα διαλύματα 25 ng/mL (n=6).

Ένωση	t_R	RSD(%)
Κατεχόλη	10,80	$2,89 \cdot 10^{-2}$
Υδροκινόνη	13,21	$0,92 \cdot 10^{-2}$
Μανδελικό Οξύ	15,55	$2,25 \cdot 10^{-2}$
Μουκονικό Οξύ	19,48	$2,19 \cdot 10^{-2}$
Ιππουρικό Οξύ	25,01	$0,24 \cdot 10^{-2}$
2 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	26,18	$0,19 \cdot 10^{-2}$
3 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	27,58	$1,17 \cdot 10^{-2}$
4 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	27,98	$0,76 \cdot 10^{-2}$

Από τον πίνακα 13 είναι εμφανές ότι οι χρόνοι ανάλυσης των 8 μεταβολιτών παραμένουν σταθεροί. Η παρατηρούμενη επαναληψιμότητα εκφρασμένη σε τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης ανέρχεται έως $2,89 \cdot 10^{-2} \%$ και κρίνεται ιδιαίτερα ικανοποιητική.

Πίνακας 14: Μέση τιμή των εμβαδών των κορυφών (Area) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD(%)) του μίγματος των μεταβολιτών από τα πρότυπα διαλύματα 5,7 και 50 ng/mL (n=6).

Ένωση	5,7 ng/mL		50 ng/mL	
	Area	RSD(%)	Area	RSD(%)
Κατεχόλη	46439	5,33	196058	3,09
Υδροκινόνη	150778	0,52	314217	3,13
Μανδελικό Οξύ	28770	6,20	117126	3,31
Μουκονικό Οξύ	6412	3,21	27594	4,50
Ιππουρικό Οξύ	3763	7,99	11517	6,79
2 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	3590	3,60	12787	8,91
3 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	3106	1,24	8435	8,00
4 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	3245	0,93	8063	3,24

Από τον πίνακα 14 είναι φαίνεται ότι το εμβαδό των κορυφών των 8 μεταβολιτών παραμένει σταθερό. Η παρατηρούμενη επαναληψιμότητα εκφρασμένη σε τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης ανέρχεται έως 8,91% και κρίνεται ικανοποιητική.

5.6.7.4 Αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου

Όσον αφορά την αναπαραγωγιμότητα των χρόνων ανάσχεσης χρησιμοποιήθηκαν συνολικά έξι (6) πρότυπα διαλύματα στις ίδιες συγκεντρώσεις. Ελέγχθηκαν, τρία (3) δείγματα που έγιναν την πρώτη μέρα και τρία (3) δείγματα που έγιναν τη δεύτερη μέρα. Έτσι εξετάστηκε η διακύμανση των χρόνων ανάσχεσης και του εμβαδού των κορυφών σε διαφορετικό χρόνο ανάλυσης.

Στους Πίνακες 15 και 16 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αναπαραγωγιμότητας από ημέρα σε ημέρα.

Πίνακας 15: Μέση τιμή των χρόνων ανάσχεσης (t_R) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD(%)) των 8 μεταβολιτών των BTEX από τα πρότυπα διαλύματα από ημέρα σε ημέρα (N=6).

Ένωση	t_R	RSD(%)
Κατεχόλη	10,81	$2,08 \cdot 10^{-2}$
Υδροκινόνη	13,21	$3,57 \cdot 10^{-2}$
Μανδελικό Οξύ	15,55	$3,17 \cdot 10^{-2}$
Μουκονικό Οξύ	19,48	$2,55 \cdot 10^{-2}$
Ιππουρικό Οξύ	25,01	$0,26 \cdot 10^{-2}$
2 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	26,19	$2,85 \cdot 10^{-2}$
3 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	27,58	$1,57 \cdot 10^{-2}$
4 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	27,98	$1,08 \cdot 10^{-2}$

Από τον πίνακα 15 φαίνεται ότι οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις των χρόνων ανάσχεσης των μεταβολιτών από ημέρα σε ημέρα ανέρχονται έως $3,57 \cdot 10^{-2}$ %.

Πίνακας 16: Μέση τιμή των εμβαδών των κορυφών (Area) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD(%)) του μίγματος των μεταβολιτών από τα πρότυπα διαλύματα 5,7 και 50 ng/mL από ημέρα σε ημέρα (N=6).

Ένωση	5,7 ng/nL		50 ng/mL	
	Area	RSD(%)	Area	RSD(%)
Κατεχόλη	45389	5,16	190558	3,29
Υδροκινόνη	151113	0,47	304384	3,87
Μανδελικό Οξύ	28605	4,42	124293	3,09
Μουκονικό Οξύ	6507	2,12	28027	2,53
Ιππουρικό Οξύ	3805	5,40	11650	4,72
2 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	3587	2,80	12570	4,61
3 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	3178	2,98	8685	4,40
4 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	3173	1,98	7916	2,90

Από τον πίνακα 16 φαίνεται ότι οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις των εμβαδών των κορυφών των μεταβολιτών των ΒΤΕΧ από ημέρα σε ημέρα ανέρχονται έως 5,40%.

5.6.7.5 Ορθότητα μεθόδου, όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Επίσης πραγματοποιήθηκε έλεγχος των ανακτήσεων για τον προσδιορισμό κάθε αναλύτη μέσω της μέτρησης εμβολιασμένων δειγμάτων. Γνωρίζοντας τη συγκέντρωση που θεωρητικά έχουμε μέσα στα διαλύματα για κάθε μία ένωση με τη βοήθεια των εξισώσεων αναφοράς και των εμβαδών που ελήφθησαν για την κάθε ένωση, υπολογίζεται η πειραματική συγκέντρωση για κάθε ένα επίπεδο. Ο λόγος της πειραματικής συγκέντρωσης προς τη θεωρητική επί εκατό, δίνει την εκατοστιαία ανάκτηση για την κάθε ένωση. Από τις τρεις τιμές ανάκτησης που προκύπτουν, λαμβάνεται ο μέσος όρος αυτών.

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν έξι (6) εμβολιασμένα δείγματα τελικής συγκέντρωσης 12,5 ng/mL και 50 ng/mL. Τα αποτελέσματα των ανακτήσεων παρουσιάζονται στον πίνακα 17 και κρίνονται ικανοποιητικά και για τα δύο επίπεδα συγκέντρωσης.

Πίνακας 17: Εκατοστιαίο ποσοστό ανάκτησης των μεταβολιτών ΒΤΕΧ σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης. (αριθμός μετρήσεων n=6).

	12,5 ng/mL	50 ng/mL
Ένωση	(Ανάκτηση \pm SD)%	
Κατεχόλη	82 \pm 3,3	85 \pm 4,6
Υδροκινόνη	104 \pm 8,6	113 \pm 9,2
Μανδελικό Οξύ	83 \pm 2,3	88 \pm 3,2
Μουκονικό Οξύ	88 \pm 5,6	92 \pm 4,2
Ιππουρικό Οξύ	94 \pm 7,5	95 \pm 6,3
2 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	87 \pm 3,5	98 \pm 4,7
3 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	89 \pm 4,8	85 \pm 3,5
4 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	93 \pm 6,5	102 \pm 8,1

Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου, υπολογίστηκαν από την εξαπλή ανάλυση λευκών δειγμάτων, δηλαδή από περιοχές με χαμηλό υπόβαθρο ρύπανσης. Από τα σήματα που ελήφθησαν (εμβαδόν απόκρισης ή λόγο εμβαδών των αποκρίσεων) υπολογίστηκαν με τη βοήθεια των εξισώσεων παλινδρόμησης οι έξι συγκεντρώσεις και στη συνέχεια υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (s_r) των τριών τιμών για κάθε μια ένωση από τους 8 μεταβολίτες των ΒΤΕΧ. Η τυπική απόκλιση αυτών, πολλαπλασιασμένη επί 3,3 έδωσε το όριο ανίχνευσης και επί 10 το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου για τους 8 μεταβολίτες. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 18).

Πίνακας 18: Όριο ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) για τους οκτώ υπό προσδιορισμό μεταβολίτες των BTEX.

LOD – LOQ μεθόδου (ng/mL)		
Ένωση	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Κατεχόλη	2,28	6,91
Υδροκινόνη	2,42	7,32
Μανδελικό Οξύ	2,25	6,83
Μουκονικό Οξύ	0,88	2,68
Ιππουρικό Οξύ	4,40	13,3
2 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	1,84	5,57
3 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	1,27	3,84
4 – Μεθυλ – ιππουρικό Οξύ	1,85	5,62

5.6.7.6 Σχολιασμός μεθόδου

Τα συμπεράσματα που εξάγονται κατά την επικύρωση της μεθόδου προσδιορισμού των μεταβολιτών BTEX, δηλαδή για τον έλεγχο της γραμμικότητας, της ειδικότητας και πιστότητας, την εύρεση των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης καθώς και τον υπολογισμό των ανακτήσεων των ενώσεων-στόχων από εμβολιασμένους, με πρότυπο διάλυμα μίγματος των μεταβολιτών γνωστής συγκέντρωσης, σε ορούς είναι:

α) Κατά τον έλεγχο της πιστότητας παρατηρήθηκε ότι η επαναληψιμότητα καθώς η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου είναι μέσα στα επιτρεπόμενα όρια (RSD= ±15%).

β) Κατά τον έλεγχο της γραμμικότητας διαπιστώθηκε ότι υπάρχει πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ της κάθε μετρούμενης παραμέτρου και της συγκέντρωσης του κάθε αναλύτη στο πρότυπο διάλυμα και αυτό είναι εμφανές από τον συντελεστή συσχέτισης, διότι είναι πολύ κοντά στο 1. Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι οι καμπύλες αναφοράς διέρχονται από την αρχή των αξόνων. Συνεπώς, δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα.

γ) Κατά τον έλεγχο της ειδικότητας αναλύθηκε λευκό δείγμα και διαπιστώθηκε ότι η μήτρα δεν προκαλεί παρεμποδίσσεις στην ανάλυση των μεταβολιτών.

δ) Κατά τον υπολογισμό των ανακτήσεων των ενώσεων στόχων από εμβολιασμένους, με πρότυπο διάλυμα μίγματος γνωστής συγκέντρωσης (25 ng mL⁻¹ και 50 ng mL⁻¹ τη κάθε φορά), φυσιολογικούς ορούς, παρατηρήθηκε ότι οι περισσότεροι μεταβολίτες των BTEX είχαν ανακτήσεις $\pm 20\%$, οι οποίες είναι αποδεκτές. Ενώσεις που βρίσκονται εκτός των ορίων αυτών, πιθανώς λόγω της πτητικότητάς τους εξατμίζονται στο στάδιο της συμπύκνωσης κατά την προκατεργασία του δείγματος.

ε) Βρέθηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Γενικώς, η μέθοδος κρίνεται κατάλληλη για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών των BTEX.

5.7 Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία διπλώματος ειδίκευσης αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος για τον προσδιορισμό μεταβολιτών του βενζολίου, τολουολίου, αιθυλοβενζολίου και ξυλολίου. Κατά την επικύρωση εξετάστηκαν η γραμμικότητα, η πιστότητα, η ειδικότητα, οι ανακτήσεις ενώ υπολογίστηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Η μέθοδος κρίνεται ικανοποιητική για τον προσδιορισμό όλων των υπό εξέταση αναλυτών.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε σε δείγματα φυσιολογικού ορού αίματος.

Η ανάλυση των πρώτων δειγμάτων έδειξε ότι ο προσδιορισμός των μεταβολιτών BTEX πραγματοποιήθηκε ικανοποιητικά και επομένως πρόκειται για μια αξιόπιστη μέθοδο μέσω της οποίας δίνεται η δυνατότητα να καταλάβουμε αν ο ασθενής έχει εκτεθεί σε BTEX, με όποιους κινδύνους συνεπάγεται αυτό.

6. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

POP	Persistent Organic Pollutant
PM	Particulate Matter
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
BTEX	Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylene
%RSD	(%) Relative Standard Deviation
L-DOPA	L-3,4-διυδροξυ φαινυλαλανίνη
IARC	International Agency for Research on Cancer
EPA	Environmental Protection Agency
GC- MS	Gas Chromatography- Mass Spectrometry
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
VOCs	Volatile Organic Compounds
MA	Muconic Acid
ttMA	trans, trans – Muconic Acid
EI	Electron Impact Ionization
WBCs	White Blood Cells
RBCs	Red Blood Cells
LLE	Lequid Lequid Extraction
SPE	Solid Phase Extraction
BSTFA	N,O bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide
LOD	Limit of detection
SD	Standard Deviation
LOQ	Limit of Quantification
ΕΚΠΑ	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

1. Βογιατζής Αθανάσιος, Ατμοσφαιρική ρύπανση και ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, Μεσολόγγι, **2010**.
2. <https://www.eea.europa.eu/el/themes/air/intro> (τελευταία επίσκεψη Αύγουστος 2020)
3. Γεντεκάκης Β.Ι., Ατμοσφαιρική Ρύπανση, Επιπτώσεις, Έλεγχος και Εναλλακτικές τεχνολογίες, 1η ΕΚΔΟΣΗ Εκδόσεις Κλειδάριθμος, Αθήνα, **2010**.
4. Sagar V. Krupa, Air pollution, people and plants. Minnesota: the American Phytopathological society, **1997**.
5. Pallavi Saxena, Vaishali Naik, Air Pollution: Sources, Impacts and Controls, **2018**.
6. Katsouyanni K., Ambient air pollution and health, *British Medical Bulletin*, vol. 68, no. 1, **2003**, pp. 143-156.
7. Lakshmi Narayana Suvarapu and Sung-Ok Baek, Determination of heavy metals in the ambient atmosphere: A review, *Toxicology and Industrial Health*, vol. 33(I), **2017**, pp 79 – 96.
8. Jarup, L., Hazards of heavy metal contamination, *British Medical Bulletin*, vol. 68, no. 1, **2003**, pp. 167-182.
9. Κουϊμπζής Θ., Φυτιανός Κ., Σαμαρά Κωνσταντίνου Κ., *Χημεία Περιβάλλοντος*, 1η ΕΚΔΟΣΗ, University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 1998.
10. Wania F. and Mackay D., Tracking the distribution of Persistent Organic Pollutants, *Environmental Science and Technology*, vol. 30, no. 9, **1996**, pp. 390-396.
11. K.C. Jones, P. de Voogt, Persistent organic pollutants (POPs): state of the science, *Environmental Pollution*, vol. 100, **1999**, pp. 209 – 221.
12. Poschl, U., Atmospheric aerosols: composition, transformation, climate and health effects, *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 44, no. 46, **2005**, pp. 7520-7540.
13. Dietrich Schwela, Air Pollution and Health in Urban Areas, *Reviews on Environmental Health*, vol. 15, no. 1-2, **2000**, pp. 13 – 42.
14. World Health Organization. Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide, Global update, **2005**
15. <https://www.epa.gov/benmap/how-benmap-ce-estimates-health-and-economic-effects-air-pollution> (τελευταία επίσκεψη Αύγουστος 2020)

16. Pallavi Saxena and Chirashree Ghosh, A review of assessment of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) concentration in urban atmosphere of Delhi, *International Journal of the Physical Sciences*, vol. 7 (6), **2012**, pp. 850 – 860.
17. P.O Ukoha, N.R Ekere, C.L Timothy and V.E Agbazue, Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylenes (BTEX) Contamination of Soils and Water Bodies from Alkyd Resin and Lubricants Industrial Production Plant, *J. Chem. Soc. Nigeria*, vol. 40, no.1, **2015**, pp. 51 – 55.
18. Xiaoyong Duan and Yanxia Li, Sources and Fates of BTEX in the General Environment and Its Distribution in Coastal Cities of China, *Journal of Environmental Science and Public Health*, vol.1 (2), **2017**, pp. 86 – 106.
19. Dr Frederic Leusch and Dr Michael Bartkow, A short primer on benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) in the environment and in hydraulic fracturing fluids, *Griffith University – Smart Water Research Centre*, **2010**.
20. Francisco J. Enguita and Ana Lúcia Leitão, Hydroquinone: Environmental Pollution, Toxicity, and Microbial Answers, Hindawi Publishing Corporation – BioMed Research International, **2013**.
21. Catechol, *IARC Monographs*, vol. 71, pp. 433 – 451.
22. Nina Schweigert, Alexander J. B. Zehnder and Rik I. L. Eggen, Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals, *Environmental Microbiology*, vol. 3 (2), **2001**, pp 81 – 91.
23. Gisela Witz, Louise Latriano and Bernard D. Goldstein, Metabolism and Toxicity of trans,trans – Muconaldehyde , an Open-Ring Microsomal Metabolite of Benzene, *Environmental Health Perspectives*, vol. 82, **1989**, pp. 19 – 22.
24. Gerhard Scherer, Thomas Renner, Michael Meger, Analysis and evaluation of trans,trans – muconic acid as a biomarker for benzene exposure, *Journal of Chromatography B*, vol. 717, **1998**, pp. 179 – 199.
25. Abdul Rohim Tualeka, Yashwant Pathak, Dwi Ananto Wibrata, Bahrul Ilimi, Ahsan Ahsan, Pudji Rahmawati, Syamsiar S. Russeng, Atjo Wahyu, Maspiyah Maspiyah, Sukarmin Sukarmin, Relationship of Benzene Exposure to Trans, Trans – Muconic Acid and Blood Profile of Shoe

- Workers in Romokalisari Surabaya, Indonesia, *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, vol. 7 (5), **2019**, pp. 816 – 823.
- 26.** Rakesh Kumar, Rajesh D. Anandjiwala, Antresh Kumar, Thermal and mechanical properties of mandelic acid – incorporated soy protein films, *J Therm Anal Calorim*, **2015**.
- 27.** Aneta Wójcik, Marlena Kubiak, Helena Rotsztejn, Influence of azelaic and mandelic acid peels on sebum secretion in ageing women, *Postep Derm Alergol*, vol.30, **2013**, pp. 140 – 145.
- 28.** Kimberly M. Capella, Katharine Roland, Nathan Geldner, B. Rey deCastro, Víctor R. De Jesús, Dana van Bommel, Benjamin C. Blount, Ethylbenzene and styrene exposure in the United States based on urinary mandelic acid and phenylglyoxylic acid: NHANES 2005-2006 and 2011-2012, *Environmental Research*, vol. 171, **2019**, pp. 101 – 110.
- 29.** L. Drummond, J. Caldwell & H. K. Wilson, The metabolism of ethylbenzene and styrene to mandelic acid: Stereochemical considerations, *Xenobiotica*, vol. 19, **1989**, pp. 199 – 207.
- 30.** D. de Carvalho, V. L. Lanchote, P. S. Bonato, R.H.C. Queiroz, A.C. Santos, and S.A.C. Dreossi, A new derivatization procedure for the analysis of hippuric acid and m-methyl-hippuric acid by gas chromatography, *Int Arch Occup Environ Health*, vol. 63, **1991**, pp. 33 – 37.
- 31.** Maryam Arabi & Mehrorang Ghaedi & Abbas Ostovan, Water compatible molecularly imprinted nanoparticles as a restricted access material for extraction of hippuric acid, a biological indicator of toluene exposure, from human urine, *Microchim Acta*, vol. 184, **2017**, 879 – 887.
- 32.** A Lof, E Wigaeus Hjelm, A Colmsjo, B-O Lundmark, A Norstrom, A Sato, Toxicokinetics of toluene and urinary excretion of hippuric acid after human exposure to H-toluene, *British Journal of Industrial Medicine*, vol. 50, **1993**, pp. 55 – 59.
- 33.** Jenifer M. Langman, Xylene: Its Toxicity, Measurement of Exposure Levels, Absorption, Metabolism and Clearance, *Pathology*, **1994**, pp. 301 – 309.

34. J. Angerer, K. H. Schaller, o-, m-, p-Methylhippuric Acids (Toluric Acids) Hippuric Acid, *Biomonitoring Methods*, vol.1, **1980**, pp. 165 – 175.
35. Mohammad Behbahani & Saman Bagheri & Fariborz Omid & Mostafa Mohammadpour Amini, An amino-functionalized mesoporous silica (KIT-6) as a sorbent for dispersive and ultrasonication-assisted micro solid phase extraction of hippuric acid and methylhippuric acid, two biomarkers for toluene and xylene exposure, *Microchimica Acta*, vol. 185, **2018**.
36. M. Pietrogrande, D. Bacco, M. Mercuriali, GC–MS analysis of low – molecular - weight dicarboxylic acids in atmospheric aerosol: comparison between silylation and esterification derivatization procedures, *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 396, **2010**, pp. 877 – 885.
37. Rosa M. Flores, Paul V. Doskeya, Evaluation of multistep derivatization methods for identification and quantification of oxygenated species in organic aerosol, *Journal of Chromatography A*, vol. 1418, **2015**, pp. 1 – 11.
38. T.Y.Sanltar, Gas Chromatography - Principle and Applications, *Central Institute of Fisheries Technology*, **2005**.
39. Ιωαννίδου – Παπακωνσταντίνου Άννα, Αλεξανδράτου Αναστασία, Παρασκευούλης Στράτος, Αιματολογία – Αιμοδοσία Ι, Αθήνα, **2001**.
40. Guyton A., Φυσιολογία του Ανθρώπου. Μετάφραση : Ευαγγέλου Α., Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, 3η έκδοση, Αθήνα, **1990**, p. 44.
41. Bliss D., *Red Blood Cells Illustration*, National Cancer Institute, **2002**. (<https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=3696>) (τελευταία επίσκεψη Αύγουστος 2020).
42. Hall J.E. and Guyton A. C., *Textbook of Medical Physiology*, Elsevier Saunders, 11th Edition, **2006**, Chapter 32, pp.419 – 436.
43. Τσουφάκης Γ., Γαλακτική Οξέωση, *Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής*, vol. 18, no. 5, **2001**, pp. 451 – 45.
44. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES National Institutes of Health, National Institute of General Medical Sciences Inside the Cell, Produced by the Office of Communications and Public Liaison, **2005**.
45. Χριστίνα Καρατζαφέρη, Εγχειρίδιο για τη Σωματική Αξιολόγηση Αθλητών: Δοκιμασίες Εργαστηρίου και Πεδίου για την Επιστημονική Υποστήριξη του Αγωνιστικού Αθλητισμού, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **2015**.

46. J.D. Surratt, A.W.H. Chan, N.C. Eddingsaas, M. Chan, C.L. Loza, A.J. Kwan, S.P. Hersey, R.C. Flagan, P.O. Wennberg, J.H. Seinfeld, Reactive intermediates revealed in secondary organic aerosol formation from isoprene, *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, **2010**, pp. 6640 – 6645.
47. R. Szmigielski, J.D. Surratt, R. Vermeylen, K. Szmigielska, J.H. Kroll, N.L. Ng.
48. Little, J. L., 1999. *J. Chrom. A.*, 844, pp. 1 – 22.
49. Fu, P., Kawamura, K., Okuzawa, K., Wang, G., Kanaya, Y., Wang, Z., *J. Geophys. Res.*, **2008**, 113, D19107
50. Schauer, J. J., Rogge, W. F., Hildemann, L. M., Mazurek, M. A., Cass, G. R., *Atm. Env.*, **1996**, 30(22), pp. 3837 – 3855.
51. Simoneit, B. R. T., Kobayashi, Mochida, M., Kawamura, K., Lee, M., Lim, H. J., Turpin, B. J., Komazaki, Y., *J. Geophys. Res.*, **2004**, 109, D19S10.
52. Wang, G., Kawamura, K., *Environ. Sci. Technol.*, **2005**, 39(19), pp. 7430 – 7438.
53. E. Borrás, L.A. Tortajada-Genaro, Determination of oxygenated compounds in secondary organic aerosol from isoprene and toluene smog chamber experiments, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 92, 2012, pp. 110 - 124.
54. J. Yu, R.C. Flagan, J.H. Seinfeld, Identification of products containing –COOH, –OH, and –CO in atmospheric oxidation of hydrocarbons, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 32, **1998**, pp. 2357–2370.
55. M. Lewandowski, M. Jaoui, T.E. Kleindienst, J.H. Offenberg, E.O. Edney, Composition of PM_{2.5} during the summer of 2003 in Research Triangle Park, North Carolina, *Atmos. Environ.*, vol. 41, **2007**, pp. 4073 – 4083.
56. D.R. Cocker III, B.T. Mader, M. Kalberer, R.C. Flagan, J.H. Seinfeld, The effect of water on gas–particle partitioning of secondary organic aerosol: II. m-xylene and 1,3,5-trimethylbenzene photooxidation systems, *Atmos. Environ.*, vol. 35, **2001**, pp. 6073 – 6085.
57. A. Kubátová, R. Vermeylen, M. Claeys, J. Cafmeyer, W. Maenhaut, G. Roberts, P. Artaxo, Carbonaceous aerosol characterization in the Amazon Basin, Brazil: novel dicarboxylic acids and related compounds, *Atmos. Environ.*, vol. 34, **2000**, pp. 5037 – 5051.

58. M. Jaoui, T.E. Kleindienst, M. Lewandowski, E.O. Edney, Identification and quantification of aerosol polar oxygenated compounds bearing carboxylic or hydroxyl Groups. 1. Method development, *Anal. Chem.*, vol. 76, **2004**, pp. 4765 – 4778.
59. R.M. Le Lacheur, L.B. Sonnenberg, P.C. Singer, R.F. Christman, M.J. Charles, Identification of carbonyl compounds in environmental samples, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 27, **1993**, pp. 2745 – 2753.
60. M. Jaoui, E. Corse, T.E. Kleindienst, J.H. Offenberg, M. Lewandowski, E.O. Edney, Analysis of secondary organic aerosol compounds from the photooxidation of d-limonene in the presence of NOX and their detection in ambient PM2.5, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, **2006**, pp. 3819 – 3828.
61. M. Jaoui, T.E. Kleindienst, M. Lewandowski, J.H. Offenberg, E.O. Edney, Identification and quantification of aerosol polar oxygenated compounds bearing carboxylic or hydroxyl groups. Organic tracer compounds from monoterpenes, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, **2005**, pp. 5661 – 5673.
62. J. Yu, H.E. Jeffries, K.G. Sexton, Atmospheric photooxidation of alkylbenzenes – I Carbonyl product analyses, *Atmos. Environ.*, vol. 31, **1997**, pp. 2261 – 2280.
63. K. Kowalewski, T. Gierczak, Multistep derivatization method for the determination of multifunctional oxidation products from the reaction of apinene with ozone, *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, **2011**, pp. 7264 – 7274.
64. S. Kundu, K. Kawamura, M. Lee, Seasonal variations of diacids, ketoacids, and adicarbonyls in aerosols at Gosan, Jeju Island, South Korea: Implications for sources, formation, and degradation during longrange transport, *J. Geophys. Res.*, vol. 115, **2010**, D19307.
65. K. Kawamura, Identification of C2-C10.omega.-oxocarboxylic acids, pyruvic acid, and C2-C3.alpha.-dicarbonyls in wet precipitation and aerosol samples by capillary GC and GC/MS, *Anal. Chem.*, vol. 65, **1993**, pp. 3505 – 3511.
66. Y.-C. Li, J.Z. Yu, Simultaneous determination of mono- and dicarboxylic acids, m-oxo-carboxylic acids, midchain ketocarboxylic acids, and aldehydes in atmospheric aerosol samples, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, **2005**, pp. 7616 – 7624.

67. C.-L. Hsu, W.-H. Ding, Determination of low-molecular-weight dicarboxylic acids in atmospheric aerosols by injection-port derivatization and gas chromatography–mass spectrometry, *Talanta*, vol. 80, **2009**, pp. 1025 – 1028.
68. A. Limbeck, H. Puxbaum, L. Otter, M.C. Scholes, Semivolatile behavior of dicarboxylic acids and other polar organic species at a rural background site (Nylsvley, RSA), *Atmos. Environ.*, vol. 35, **2001**, pp. 1853 – 1862.
69. J. Ray, S.R. McDow, Dicarboxylic acid concentration trends and sampling artifacts, *Atmos. Environ.*, vol. 39, **2005**, pp. 7906 – 7919.
70. M. Lewandowski, M. Jaoui, J.H. Offenberg, T.E. Kleindienst, E.O. Edney, R.J. Sheesley, J.J. Schauer, Primary and secondary contributions to ambient PM in the Midwestern United States, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, **2008**, pp. 3303 – 3309.
71. F. Moretti, E. Tagliavini, S. Decesari, M.C. Facchini, M. Rinaldi, S. Fuzzi, NMR determination of total carbonyls and carboxyls: a tool for tracing the evolution of atmospheric oxidized organic aerosols, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, **2008**, pp. 4844 – 4849.
72. M. Pietrogrande, D. Bacco, M. Mercuriali, GC–MS analysis of low-molecular weight dicarboxylic acids in atmospheric aerosol: comparison between silylation and esterification derivatization procedures, *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 396, **2010**, pp. 877 – 885.
73. Ευαγγελία Χ. Μπέκου, Βελτιστοποίηση και Επικύρωση UHPLC – DAD Μεθόδου με online Εκχύλιση Στερεάς Φάσης για τον Ποσοτικό Προσδιορισμό των 25 – Υδροξυ – Βιταμινών D₃/D₂ σε Πλάσμα Αίματος και Εφαρμογή σε Κλινικά Δείγματα, Θεσσαλονίκη, **2018**.