



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Τεχνική αναφορά μεθοδολογίας επεξεργασίας δειγμάτων οργανικών βιοδεικτών

1. Αναλυτική μεθοδολογία

Για την ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό του οργανικού υλικού στα δείγματα που συλλέχθηκαν, αναπτύχθηκε ένα αναλυτικό πρωτόκολλο υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και μεγάλης ευαισθησίας, που ανταποκρίνεται στις ιδιαιτερότητες της ανάλυσης των διαφόρων κατηγοριών οργανικών ενώσεων. Οι ιδιαιτερότητες αυτές συνοψίζονται στα εξής: α) οι οργανικές ενώσεις βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (pg/gr έως ng/gr) και β) για τον προσδιορισμό των διαφόρων κατηγοριών οργανικών ενώσεων (άπολες, πολικές, πολικές, όξινες, ουδέτερες) απαιτούνται διαφορετικά αναλυτικά στάδια.

Τα κυριότερα επιμέρους στάδια του αναλυτικού πρωτοκόλλου περιέλαβαν τον καθαρισμό των δειγμάτων και την εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες για την απομόνωση του οργανικού υλικού, τον διαχωρισμό με υγρή χρωματογραφία του ολικού οργανικού υλικού στις επιμέρους κατηγορίες οργανικών ενώσεων, την μετατροπή των ύδροξυ- και καρβόξυλο-ομάδων σε έστερο-ομάδες, και τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων με αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography - GC), σε συνδυασμό με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector - FID) και ανιχνευτή φασματοσκοπίας μάζας (Mass Spectrometry Detector - MSD).

1.1 Κατεργασία των δειγμάτων και απομόνωση του ολικού οργανικού εκχυλίσματος (TOE)

Για την απομόνωση του ολικού οργανικού υλικού του ιζήματος, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με συνδυασμό οργανικών διαλυτών. 25 έως 50 g ιζήματος, τοποθετήθηκαν σε φυσίγγιο ινών υάλου (glass fiber cartridge), καλύφθηκαν με βαμβάκι και εκχυλίστηκαν σε συσκευή Soxhlet με 250 ml CH_2Cl_2 και CH_3OH (αναλογία 4:1), για 18-24 ώρες. Στη συνέχεια, το εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε καθαρή φιάλη μέσω διηθητικού ηθμού ο οποίος περιείχε Na_2SO_4 ως ξηραντικό. Ακολούθησε συμπύκνωση του διαλύτη στο rota-ναρ έως 1-2 ml και κατόπιν έως ξηρού, υπό ροή αζώτου.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

1.2 Διαχωρισμός του οργανικού υλικού (ΤΟΕ) ανά κατηγορίες ενώσεων

Το ΤΟΕ αποτελεί μίγμα ενώσεων διαφορετικής πολικότητας. Για να γίνει δυνατή η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση, σύμφωνα με τις ιδιαιτερότητες που παρουσιάζει η κάθε κατηγορία ενώσεων, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός με στήλη υγρής χρωματογραφίας υπό ροή αζώτου 1.4 ml/min. Τα μίγματα διαλυτών έκλουσης είναι αυξανόμενης πολικότητας. Η ικανότητα διαχωρισμού των διαφόρων ομολόγων σειρών ενώσεων καθώς και οι ανακτήσεις τους έχουν δοκιμαστεί με μίγμα πρότυπων ενώσεων από τις διάφορες κατηγορίες ενώσεων (Gogou et al., 1998).

Βιβλιογραφία

Gogou, A., Apostolaki, M., Stephanou, E.G., 1998. Determination of organic molecular markers in marine aerosols and sediments: one-step flash chromatography compound class fractionation and capillary gas chromatographic analysis. *J. Chromatogr.* 799, 215– 231.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

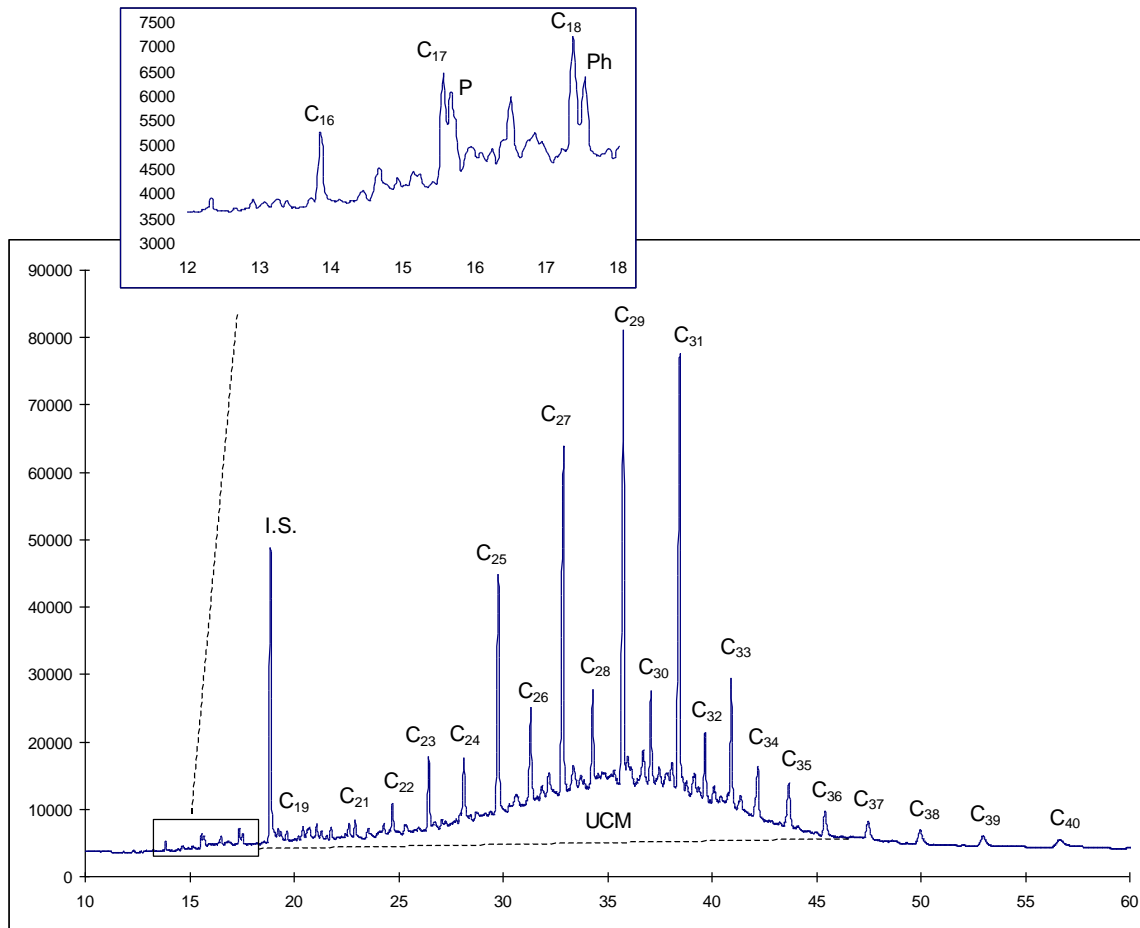


ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Σχήμα 1: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα του συστήματος GC-FID: πρώτο κλάσμα της υγρής χρωματογραφίας, όπου:

C_n: κ-Αλκάνια (όπου n: ο αριθμός ατόμων άνθρακα)

Pr: Πριστάνιο

Ph: Φυτάνιο

UCM: Μίγμα μη διαχωρισμένων υδρογονανθράκων



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

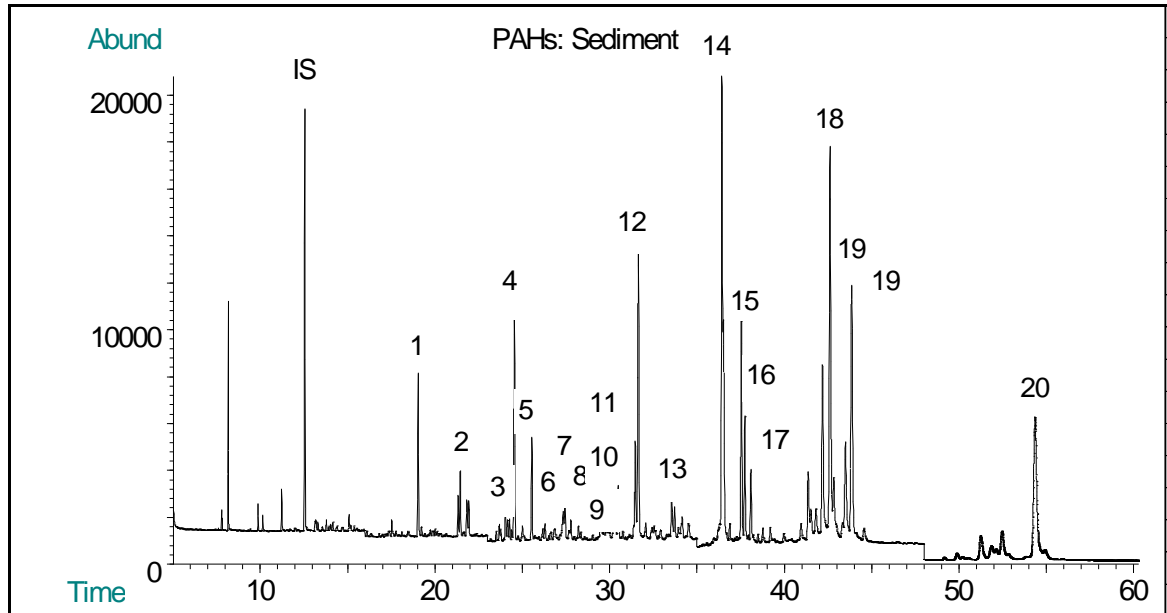


ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Σχήμα 2: Χαρακτηριστικό GC-MS (SIM) χρωματογράφημα του δεύτερου κλάσματος της υγρής χρωματογραφίας: Πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες

1. Φενανθρένιο (178)
2. Μέθυλο-φενανθρένια (192)
3. Διμεθυλο-φενανθρένια (206)
4. Φλουορανθένιο (202)
5. Πυρένιο (202)
6. Τριμέθυλο-φενανθρένια (220)
7. Μέθυλο-φλουορανθένια & Μέθυλο-πυρένια (216)
8. Ρετένιο (234)
9. Διμέθυλο-φλουορανθένια & -πυρένια (230)
10. 4(H)-Κύκλο-[cd]-πυρένιο (226)
11. Βένζο[a]ανθρακένιο (228)
12. Χρυσένιο/Τριφαινυλαίνιο (228)
13. Μέθυλο-χρυσένιο (242)
14. Βένζο[b/j/k]φλουορανθένιο (252)
15. Βένζο[e]πυρένιο (252)
16. Βένζο[a]πυρένιο (252)
17. Περυλένιο (252)
18. Ίνδανο[1,2,3-cd]πυρένιο (276)
19. Βένζο[ghi]φλουορανθένιο (276)
20. Κορονένιο (300)

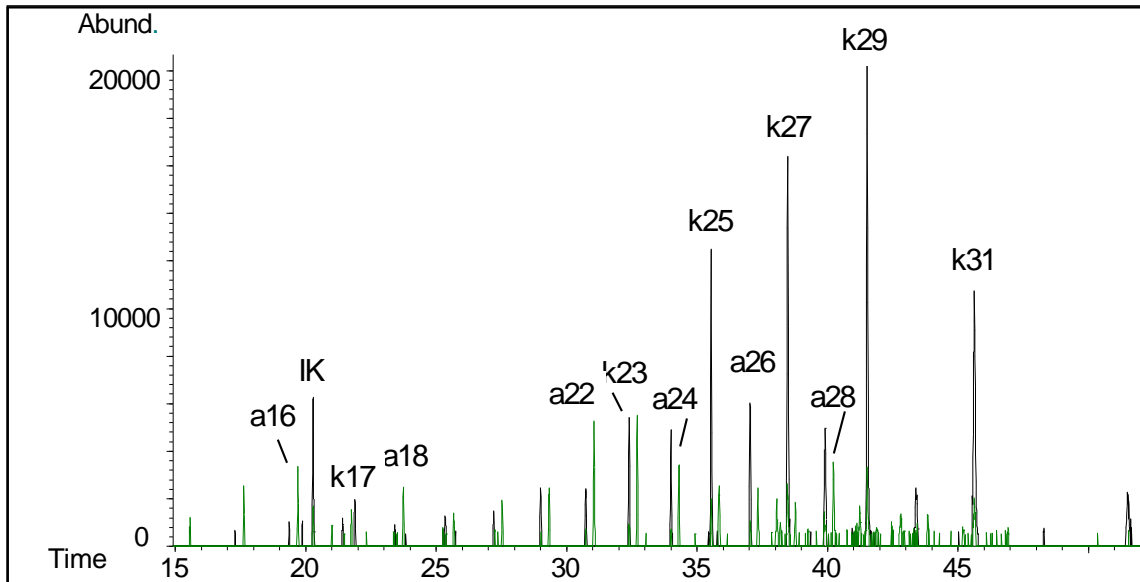


Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Σχήμα 3: Χαρακτηριστικό GC-MS (TIC) χρωματογράφημα: κ-αλκανάλες και αλκανόνες-2, όπου:

an: κ-αλκανάλη, n αριθμού ατόμων άνθρακα.

kn: αλκανόνη-2, n αριθμού ατόμων άνθρακα.

IK: 6,10,14-τριμέθυλο-πενταδεκανόνη-2

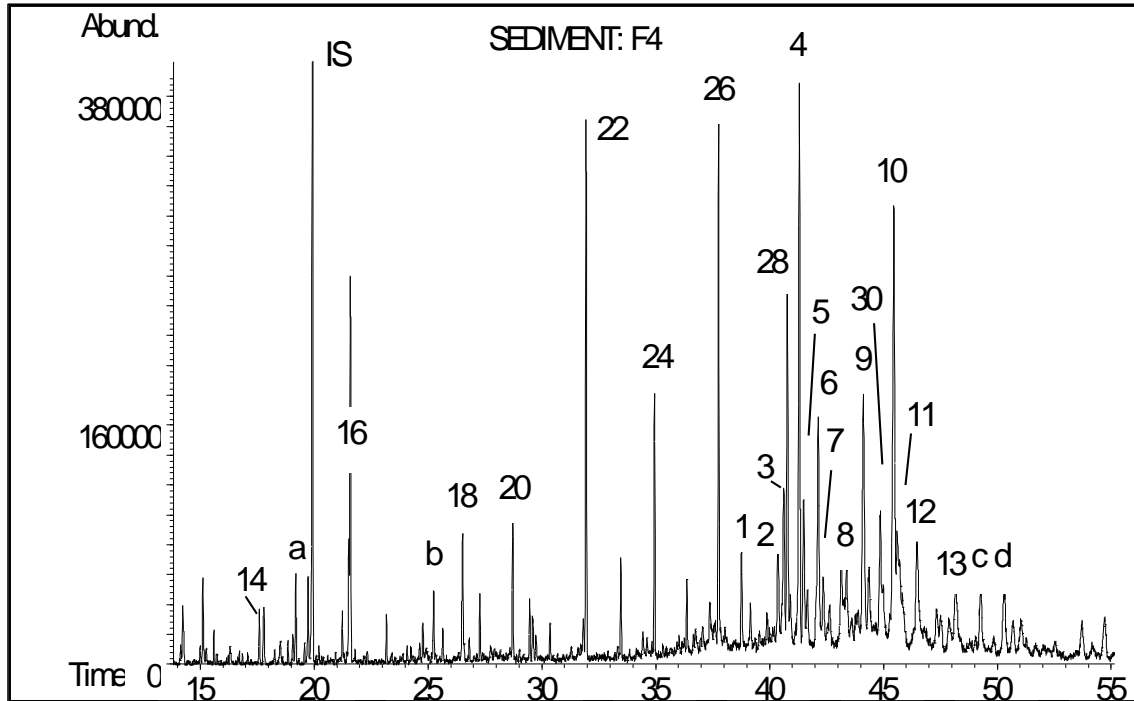


Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Σχήμα 4: Χαρακτηριστικό TIC χρωματογράφημα του συστήματος GC-MS: τέταρτο κλάσμα της υγρής χρωματογραφίας.

C ₂₆	1. 24-Νορχολέστα-5,22(E)-διέν-3β-όλη
C ₂₆	2. 27-Νορ-24-μέθυλο-χολέστα-5,22(E)-διέν-3β-όλη
C ₂₇	3. Χολέστα-5,22(E)-διέν-3β-όλη
C ₂₇	4. Χολέστα-5-εν-3β-όλη
C ₂₇	5. 5α(H)-Χολεσταν-3β-όλη
C ₂₈	6. 24-Μέθυλοχολέστα-5,22-διέν-3β-όλη
C ₂₈	7. 24-Μέθυλο-5α(H)-χολέστα-22(E)-εν-3β-όλη
C ₂₈	8. 24-Μεθύλενοχολέστ-5-εν-3β-όλη
C ₂₉	9. 24-Αίθυλο-χολέστα-5,22(E)-διέν-3β-όλη
C ₂₉	10. 24-Αίθυλοχολέστα-5-εν-3β-όλη
C ₂₉	11. 24-Αίθυλο-5α(H)-χολεσταν-3β-όλη
C ₃₀	12. 4a,23,24-Τριμέθυλο-5α(H)χολέστ-22(E)-εν-3β-όλη
C ₃₀	13. 4a,23,24-Τριμέθυλο-5α(H)χολεσταν-3β-όλη
	14 - 30: κ-Αλκανόλες (αριθμός ατόμων άνθρακα).
	α: ΙΚ
	β: Φυτόλη
	γ: 1,15-τριακόντανο-διόλη
	δ: τριακόντα-15-κέτο-1-όλη



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

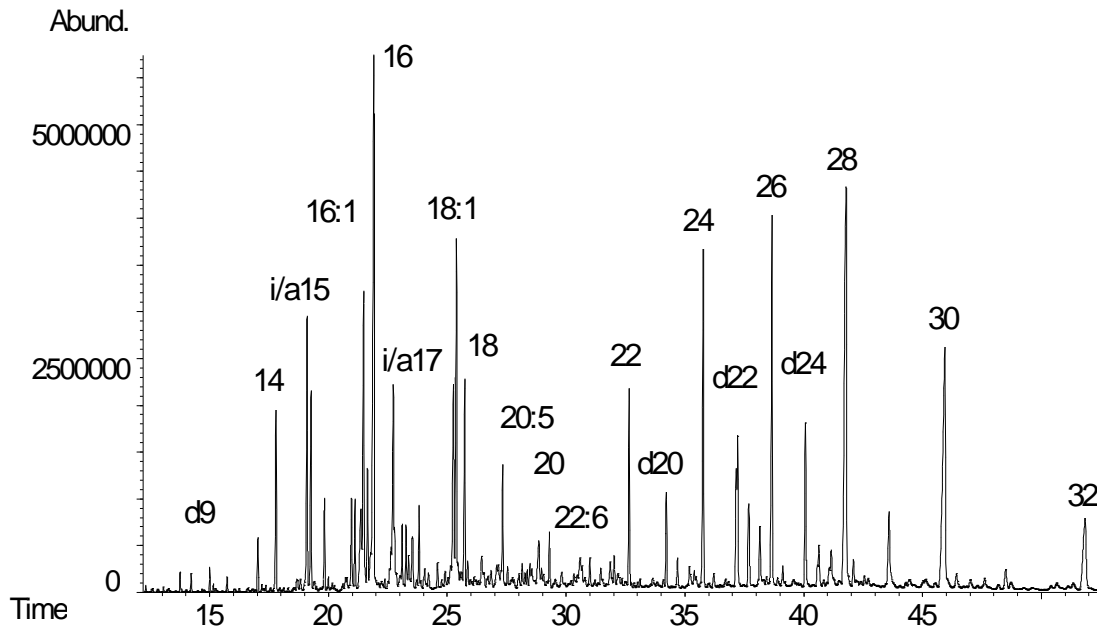


ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Σχήμα 5: Χαρακτηριστικά GC-MS (TIC) χρωματογραφήματα: αλιφατικά οξέα, όπου:
14-32 : κ-αλκανοϊκά οξέα (αντιστοιχεί στον αριθμό ατόμων άνθρακα).
Cn:x : Ακόρεστα οξέα (n και x αντίστοιχα: ο αριθμός ατόμων άνθρακα και διπλών δεσμών).
dn: δικαρβοξυλικά οξέα, n αριθμού ατόμων άνθρακα.