



Πολυτεχνείο Κρήτης
Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος
Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών:
«Περιβαλλοντική και Υγειονομική Μηχανική»

Μεταπτυχιακή διατριβή

**Διερεύνηση παραμέτρων που επηρεάζουν τη
μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού.**

“Vac-HSSPME”

ΑΝΤΩΝΙΑ ΜΟΥΣΟΥΡΑΚΗ

Εξεταστική Επιτροπή:

Ψυλλάκη Ελευθερία (επιβλέπουσα)

Καλογεράκης Νικόλαος

Διαμαντόπουλος Ευάγγελος

Χανιά, 2012

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα.....	01
Ευχαριστίες.....	05
Περίληψη.....	06
Εισαγωγή.....	08
Κεφάλαιο 1^ο «ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ»	
1.1 Τεχνική Εκχύλισης.....	10
1.1.1 Υγρή – υγρή εκχύλιση (Liquid – Liquid Extraction, LLE)	10
1.1.2 Εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)	11
1.2 Τεχνική Μικροεκχύλισης.....	13
1.2.1 Μέθοδος μικροεκχύλισης υγρής φάσης, LPME.....	14
Κεφάλαιο 2^ο «ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ (SOLID PHASE MICROEXTRACTION – SPME)»	
2.1 Εισαγωγικά.....	18
2.2 Θεωρία SPME.....	21
2.2.1 Τρόποι εφαρμογής της SPME.....	24
2.2.2 Παράμετροι επίδρασης στην αποτελεσματικότητα της SPME	27
Κεφάλαιο 3^ο «ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΦΑΣΕΩΝ»	
3.1 Συντελεστής Λιποφιλίας ή Κατανομής οκτανόλης/νερού K_{ow} (ή P).....	29
3.2 Σταθερά του Henry-Μεταφορά οργανικών ενώσεων μεταξύ υδάτων και ατμόσφαιρας	30
Κεφάλαιο 4^ο «ΠΟΛΥΚΥΚΛΙΚΟΙ ΑΡΩΜΑΤΙΚΟΙ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ (ΠΑΥ)»	

4.1 Δομή των ΠΑΥ	32
4.2 Φυσικές ιδιότητες των ΠΑΥ	32
4.3 Χημικές ιδιότητες των ΠΑΥ	34
4.4 Πηγές ΠΑΥ	34
4.5 Τύχη των ΠΑΥ στο περιβάλλον	35
Κεφάλαιο 5^ο «ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΗ ΦΑΣΗ (HEADSPACE SOLID-PHASE MICROEXTRACTION, HSSPME)»	
5.1 Θεωρία	37
5.2 Ενώσεις-στόχοι κατά την εφαρμογή HSSPME	38
5.3 Σύστημα τριών φάσεων	40
Κεφάλαιο 6^ο «ΘΕΩΡΙΑ SPME»	
6.1 Θερμοδυναμική θεωρία SPME	43
6.2 Θεωρία HSSPME-Επίδραση πίεσης	45
Κεφάλαιο 7^ο «ΕΚΧΥΛΙΣΤΙΚΗ ΦΑΣΗ-SPME FIBER»	
7.1 Συσκευή μικρο-εκχύλισης στερεής φάσης (SPME fiber holders)	51
7.2 Ίνα επικαλυμμένη με πολυμερές υλικό	52
7.2.1 Υγρές-Στερεές επικαλύψεις ίνας	53
7.2.2 Επιλογή ίνας	56
7.2.2.1 PDMS	57
7.2.2.2 PA	59
7.2.2.3 Μικτές επιστρώσεις	59
7.3 Μηχανισμός Απορρόφησης – Προσρόφησης	61
Κεφάλαιο 8^ο «ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΟΝΤΙΚΗΣ ΙΣΧΥΟΣ, pH & ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ SPME»	

8.1 Επίδραση ιοντικής ισχύος.....	64
8.2 Επίδραση pH.....	66
8.3 Επίδραση Θερμοκρασίας.....	67
Κεφάλαιο 9^ο «ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ SPME»	
9.1 Θεωρία Ανάδευσης.....	70
9.2 Μορφές ανάδευσης.....	71
Κεφάλαιο 10^ο «ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ (ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ)»	
10.1 Ορισμός χρόνου εκχύλισης (ισορροπίας).....	74
10.2 Χρόνος εκχύλισης υπό συνθήκες μειωμένης πίεσης – Επίδραση στην αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ των φάσεων του συστήματος.....	76
Κεφάλαιο 11^ο «ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΓΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ, ΕΚΧΥΛΙΣΤΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ & ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΗΣ ΦΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ SPME»	
11.1 Επίδραση όγκου δείγματος.....	78
11.2 Επίδραση όγκου φάσης εκχύλισης.....	79
11.3 Επίδραση όγκου της υπερκείμενης αέριας φάσης.....	81
Κεφάλαιο 12^ο «ΣΤΑΔΙΟ ΕΚΡΟΦΗΣΗΣ & ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΣΕ ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΟΡΓΑΝΟ GC/MS»	
12.1 Εκρόφηση.....	83
Κεφάλαιο 13^ο «ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ»	
13.1 Αντιδραστήρια.....	86
13.2 Όργανα – Συσκευές.....	86
13.3 Πειραματική διαδικασία.....	87
13.4 Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού των ΠΑΥ με χρήση GC/MS.....	90
Κεφάλαιο 14^ο «ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ»	
14.1 Επίδραση της σταθεράς Henry (K_H) στην διεξαγωγή της εκχύλισης HSSPME.....	93

14.2 Επίδραση όγκου υπερκείμενης φάσης υπό συνθήκες μειωμένης πίεσης	95
14.3 Επίδραση ανάδευσης στην Vac-HSSPME.	98
14.4 Διαγράμματα εκχυλιζόμενης ποσότητας αναλυτών προς το χρόνο εκχύλισης	99
14.5 Διαγράμματα εκχυλιζόμενης ποσότητας αναλυτών προς το είδος του αναλύτη.....	103
ΕΠΙΛΟΓΟΣ.....	104
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	106

”Ευχαριστίες”

Η παρούσα εργασία ξεκίνησε και τελείωσε μέσα στο ακαδημαϊκό έτος 2011-2012 στο Εργαστήριο Υδατικής Χημείας του τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια Ελευθερία Ψυλλάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όταν με δέχτηκε στο εργαστήριο της ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας, δίνοντάς μου την δυνατότητα να διευρύνω τις γνώσεις μου πάνω στην επιστήμη της Χημείας. Θα ήθελα, ακόμα, να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια Δρ. Ευαγγελία Γιαντζή και την Δρ. Κωνσταντίνα Τυροβολά για τη διάθεσή τους να με βοηθήσουν και να μου λύσουν οποιαδήποτε απορία οποιαδήποτε στιγμή το χρειαζόμουν καθ’ όλη την διάρκεια της εργασίας μου. Επίσης, δεν θα μπορούσα να παραλείψω το υπόλοιπο επιστημονικό προσωπικό του εργαστηρίου και τους συμφοιτητές μου που εκπονούσαν κι αυτοί την διπλωματική τους εργασία για την άψογη συνεργασία και την βοήθειά τους.

Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω στους φίλους μου, οι οποίοι μου συμπαραστάθηκαν και με βοήθησαν όλο αυτό τον καιρό. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου και ιδιαίτερα τα αδέρφια μου Μαρία και Κωνσταντίνο για την ηθική και οικονομική υποστήριξη όχι μόνο κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας αλλά και καθ’ όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Η παρούσα μελέτη αποδεικνύει ότι η εφαρμογή συνθηκών μειωμένης πίεσης κατά την διάρκεια μικροεκχύλισης στερεής φάσεως από την υπερκείμενη φάση πριν επέλθει η ισορροπία στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ ίνας και υπερκείμενης φάσης (**nonequilibrium VAC-HSSPME**) ενισχύει την κινητική της διαδικασίας σε σύγκριση με την εκτέλεση της μικροεκχύλισης υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Σύμφωνα με τα πειράματα που έλαβαν χώρα και με την θεωρία που επιβεβαιώνεται, η εκχύλιση των αναλυτών με χαμηλό ή με ενδιάμεσο προς χαμηλό K_H επηρεάζεται θετικά με την εφαρμογή συνθηκών μειωμένης πίεσης καθώς διασκελίζει το εμπόδιο της αντίστασης της μεταφοράς της μάζας από την υγρή φάση στην αέρια η οποία ελέγχει τον ρυθμό εξάτμισης των ημιπτητικών ενώσεων-στόχων με αποτέλεσμα συντομότερους χρόνους εκχύλισης. Η αύξηση της ταχύτητας εξάτμισης του ημιπτητικού αναλύτη οδηγεί στην άμεση αναπλήρωση της ποσότητας που ροφάται από την ίνα στον υπερκείμενο χώρο με συνέπεια να άρεται η επίδραση του υπερκείμενου όγκου στην απόδοση της εκχύλισης. Η VAC-HSSPME για αναλύτες με χαμηλή ή κοντά σε χαμηλή τιμή της σταθεράς K_H δεν φέρει κάποια επίδραση στην ποσότητα που εκχυλίζεται πριν επέλθει ισορροπία ενώ δεν επιταχύνει τους χρόνους εκχύλισης. Ο υπερκείμενος όγκος δεν επηρεάζει την εκχύλιση των αναλυτών με ενδιάμεση τιμή K_H με την χρήση και της VAC-HSSPME και της HSSPME. Το μόνο που παρατηρείται και στις δύο περιπτώσεις είναι μία ελαφριά μείωση της ευαισθησίας της μεθόδου όταν αυξάνεται ο υπερκείμενος όγκος λόγω του ότι παύει να είναι ικανοποιητική η απόδοση της ανάδευσης. Τέλος, η παρούσα μελέτη αποδεικνύει ότι η εφαρμογή ανάδευσης κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας βελτιώνει την απόδοση της VAC-HSSPME.

ABSTRACT

Nonequilibrium headspace solid-phase microextraction (HSSPME) sampling under vacuum conditions may dramatically improve extraction kinetics compared to regular HSSPME. This thesis investigates the effects of organic analyte properties and sampling parameters (headspace volume and sample agitation) on vacuum-assisted HSSPME (Vac-HSSPME). It was found that at room temperature, acceleration effects on extraction rates induced by reducing the total pressure of the sample container are important for those compounds where the Henry's law constant, K_H , is close or below the reported threshold values for low K_H solutes. For these compounds evaporation rate is controlled by mass transfer resistance in the thin gas-film adjacent to the gas/sample interface and reducing the total pressure will increase evaporation rates and result in a faster overall extraction process. Conversely, for analytes with an intermediate K_H value, Vac-HSSPME is not expected to improve extraction rates compared to regular HSSPME given that mass transfer resistance in the liquid-film becomes important. In accordance with the theory, at equilibrium, the amount of analyte extracted by the SPME fiber is not affected by the pressure conditions inside the sample container. Furthermore, Vac-HSSPME extraction kinetics for low K_H analytes were marginally affected by the tested change in headspace volume as evaporation rates dramatically increase under reduced pressure conditions and the sample responds much faster to the concentration drops in the headspace when compared to regular HSSPME. At equilibrium however, increasing the headspace volume may result in a loss of sensitivity for Vac-HSSPME similar to that observed for regular HSSPME. As expected, stirring the liquid sample was found to improve Vac-HSSPME.

Εισαγωγή

Η αναλυτική διαδικασία είναι μία πολύπλοκη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει πολλά βήματα μέχρι την διεξαγωγή των τελικών αποτελεσμάτων. Η διαδικασία αυτή αρχίζει με την δειγματοληψία και συνεχίζει με την προετοιμασία του δείγματος. Η ανάλυση τελειώνει με τον διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση των ενώσεων-στόχων με το κατάλληλο αναλυτικό όργανο. Όλα τα στάδια είναι σημαντικά για την παραλαβή σωστών αποτελεσμάτων. Τα στάδια για την ανάλυση ενός δείγματος είναι άρρητα συνδεδεμένα μεταξύ τους και ένα ελάχιστο λάθος κατά την διάρκεια ενός σταδίου επηρεάζει αρνητικά όλη την διαδικασία. Επίσης, το πιο αργό βήμα καθορίζει τον ολικό χρόνο ανάλυσης ενός δείγματος, εισάγοντας παράλληλα τα περισσότερα σφάλματα στη διαδικασία^[1].

Σήμερα, υπερσύγχρονα αναλυτικά όργανα είναι εμπορικά διαθέσιμα τα οποία χαρακτηρίζονται από την ικανότητα ανίχνευσης και ταυτοποίησης αναρίθμητων ενώσεων από περίπλοκες μήτρες. Τα πιο γνωστά και εύχρηστα αναλυτικά όργανα είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδοτικότητας (HPLC ή LC/MS) και η αέρια χρωματογραφία (GC ή GC/MS). Παρόλη την εξέλιξη στο τομέα της επιστήμης τα σύγχρονα αναλυτικά όργανα δεν μπορούν να αναλύσουν απευθείας το δείγμα, γεγονός που οδηγεί στην αδυναμία *αυτοματοποίησης των αναλυτικών βημάτων*. Αυτό συνεπάγεται ότι απαιτείται πρώτιστος ο *χειρισμός του δείγματος από τον άνθρωπο* με αποτέλεσμα να υπεισέρχονται αρκετά λάθη λόγω της ανθρώπινης συμμετοχής^[2].

Οι κλασικές τεχνικές προετοιμασίας δείγματος είναι χρονοβόρες, κουραστικές, απαιτούν μεγάλες ποσότητες τοξικών διαλυτών και περιλαμβάνουν πολλά βήματα. Συμπερασματικά, οι τεχνικές αυτές δεν είναι φιλικές προς το περιβάλλον και το κόστος πραγματοποίησής τους είναι υψηλό. Το μεγαλύτερο μειονέκτημά τους είναι η απώλεια μεγάλου μέρους της ποσότητας των αναλυτών

κατά την διαδικασία. Επομένως, η πολυπλοκότητα του σταδίου προ-επεξεργασίας της μήτρας αυξάνει το χρόνο που απαιτείται για την ολοκλήρωσή του και οδηγεί στη μείωση της ευαισθησίας της μεθόδου. Στα στάδια *δειγματοληψίας και προετοιμασίας του δείγματος* δαπανάται το 75% του συνολικού χρόνου της διαδικασίας της ανάλυσης.

Όλα τα ανώτερα προβλήματα που φέρουν οι κλασικές τεχνικές προετοιμασίας δείγματος, δημιούργησε την ανάγκη ανάπτυξης νέων τεχνικών προετοιμασίας δείγματος. Αυτές οι νέες μέθοδοι συγκεντρώνουν πλήθος από τις επιθυμητές ιδιότητες όπως υψηλή ταχύτητα, χαμηλό κόστος, μικρή απαίτηση σε διαλύτες και ολοκλήρωση μέσα σε λίγα βήματα. Γενικά ο στόχος είναι η δημιουργία απλών τεχνικών που εκτυλίσσονται σε λίγα στάδια και διαθέτουν την ικανότητα αυτοματοποίησης^[3-4].

1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

1.1 Τεχνική Εκχύλισης

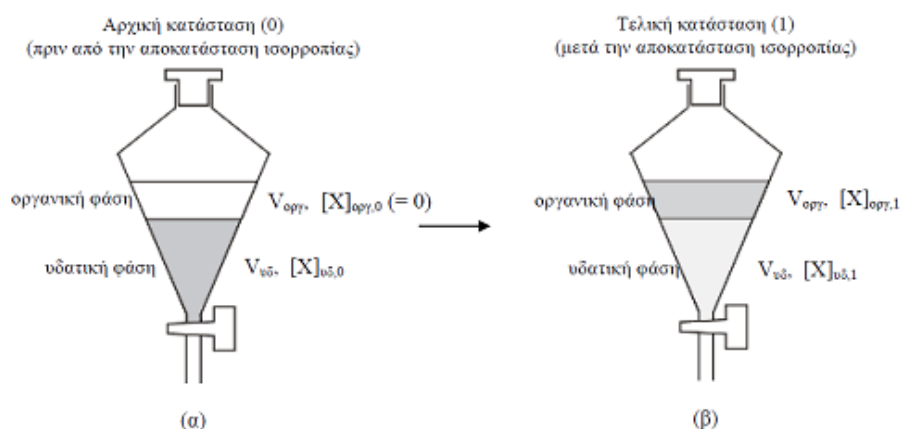
Η εκχύλιση είναι μία από τις πιο κλασικές τεχνικές διαχωρισμού και βασίζεται στην ισορροπία κατανομής μιας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων, που αναμειγνύονται ελάχιστα μεταξύ τους. Αύτη η μέθοδος συναντάται με πολλές και διαφορετικές εκδοχές ανάλογα με την φυσική κατάσταση του εκχυλιστικού μέσου και της φάσης δότη. Στις τεχνικές εκχυλίσεως συμπεριλαμβάνεται η εκχύλιση στερεών με υγρό, η εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) και η πιο συνήθης που είναι η υγρή – υγρή εκχύλιση (Liquid – Liquid Extraction, LLE)^[1-2].

1.1.1 Υγρό – υγρό εκχύλιση (Liquid – Liquid Extraction, LLE)

Η τεχνική **LLE**, δηλαδή η εκχύλιση ενός διαλύματος με ένα υγρό διαλύτη βασίζεται στην κατανομή της ένωσης στόχου, η οποία αποτελεί τη διαλυμένη ουσία του διαλύματος, μεταξύ των δύο υγρών που είναι μη αναμίξιμα, δημιουργώντας δύο φάσεις. Στην υγρή – υγρή εκχύλιση, ορισμένος όγκος του προς εκχύλιση διαλύματος φέρεται σε επαφή με ορισμένο όγκο εκχυλιστικού μέσου μέσα σε διαχωριστική χοάνη. Έπειτα, το σύστημα αναταράσσεται και αφήνεται σε ηρεμία. Μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας, οι δύο φάσεις (συνήθως υδατική και οργανική) διαχωρίζονται και λαμβάνεται εκείνη (συνήθως η οργανική φάση) που περιέχει την ένωση στόχο, της οποίας εν συνεχεία υπολογίζεται η συγκέντρωση^[1].

Η υγρή-υγρή εκχύλιση είναι μία χρονοβόρος τεχνική που απαρτίζεται από πολλά στάδια γεγονός που οδηγεί στη μειωμένη ευαισθησία της μεθόδου. Επιπλέον, η κατανάλωση μεγάλου όγκου διαλυτών όχι μόνο αυξάνει το συνολικό όγκο της

τεχνικής αλλά ταυτόχρονα, επειδή οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι τοξικοί, αυξάνουν την επικινδυνότητα κατά τον χειρισμό της μεθόδου^[1,4-5].

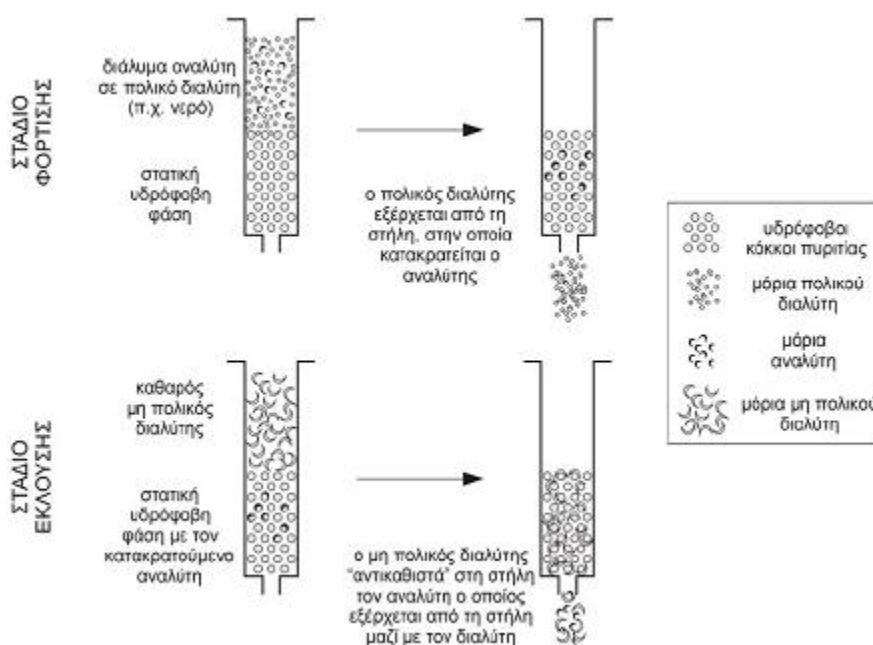


Εικ. 1.1. Εκχύλιση LLE υδατικού διαλύματος ουσίας X (κάτω στοιβάδα) με οργανικό διαλύτη (επάνω στοιβάδα) σε διαχωριστική χοάνη. (α) Αρχική κατάσταση (0), (β) Τελική κατάσταση (1) (μετά την ανατάραξη, αποκατάσταση ισορροπίας κατανομής και διαχωρισμό των φάσεων). Ο αριθμητικός δείκτης στις συγκεντρώσεις (στο σχήμα αυτό: 0 και 1) δείχνει πόσες εκχυλίσεις έχει υποστεί το αρχικό υδατικό διάλυμα^[1].

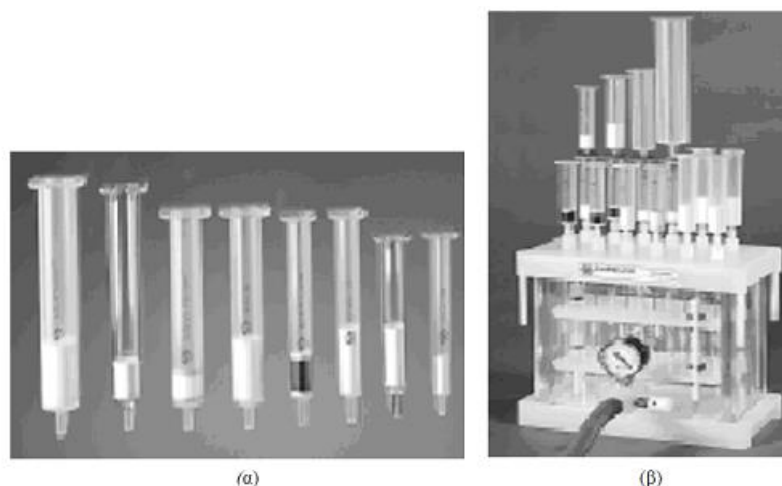
1.1.2 Εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

Η τεχνική **SPE** (εκχύλιση στερεής φάσης), αναπτύχθηκε το 1980 ως μέθοδος εμπλουτισμού και προετοιμασίας ενός δείγματος. Η SPE χρησιμοποιεί ένα στερεό προσροφητικό υλικό ως εκχυλιστική φάση η οποία εκχυλίζει οργανικές ενώσεις από υδατικά δείγματα. Είναι μία δημοφιλής τεχνική καθώς μείωσε αισθητά τον χρόνο της διαδικασίας εκχύλισης και μείωσε την απαίτηση για μεγάλους όγκους διαλυτών. Επιπλέον, διαθέτει δυνατότητα αυτοματοποίησης που οδηγεί σε μεγαλύτερης ακρίβειας αποτελέσματα καθώς αποφεύγεται η ανθρώπινη διαμεσολάβηση μεταξύ του σταδίου προ-συγκέντρωσης και του σταδίου ανάλυσης. Υπάρχουν πλέον πολλές εμπορικά διαθέσιμες συσκευές που είναι πολύ απλή η ρύθμιση τους για τις εκάστοτε ανάγκες. Επιπρόσθετα, οι ενώσεις-στόχοι συνδέονται αρκετά σταθερά με την εκχυλιστική φάση και αυτό προσδίδει την ικανότητα αποθήκευσης μετά την διαδικασία της εκχύλισης και πριν την εισαγωγή της στο αναλυτικό όργανο^[6-7].

Η SPE, όμως, περιορίζεται στην εκχύλιση ημιπηκτικών και μη πτητικών ενώσεων και περιορίζεται από την θερμοκρασία του διαλύτη εκρόφησης (desorption solvent temperature). Απώλειες της ποσότητας των αναλυτών σημειώνονται κατά το στάδιο της εξάτμισης, χαρακτηριστικό που είναι ανεπιθύμητο. Τέλος, η SPE αποτελείται από πολλά στάδια που αυξάνουν τον κίνδυνο σφάλματος στην διαδικασία οδηγώντας σε ακόμη μικρότερη ευαισθησία της μεθόδου^[6-7].



Εικ. 1.2. Διαχωρισμός με SPE αντίστροφης φάσης.



Εικ. 1.3. (α) Χαρακτηριστικοί σωλήνες-στήλες SPE. (β) Συσκευή ταυτόχρονου χειρισμού πολλών στηλών SPE (η ροή επιταχύνεται με εφαρμογή κενού)^[1].

1.2 Τεχνική Μικροεκχύλισης

Κατά τις δύο τελευταίες δεκαετίες, αναπτύχθηκε μία νέα μέθοδος η οποία ονομάζεται μικροεκχύλιση, επιτυγχάνοντας ευκολότερη προετοιμασία δείγματος, μειωμένη κατανάλωση εκχυλιστικού μέσου, και απλούστευση της αρχικής τεχνικής. Οι περισσότερες από τις μοντέρνες μεθόδους προ-συγκέντρωσης και προ-επεξεργασίας του δείγματος βασίζονται στις κλασικές τεχνολογίες εκχύλισης, συγκεκριμένα αποτελούν την μικρογραφία της LLE και της SPE. Η σμίκρυνση των κλασικών τεχνικών εκχύλισης υπερνίκησε πολλά προβλήματα που εμφανίζονταν κατά την ανάλυση. Συντέλεσε στην ελαχιστοποίηση της απαιτούμενης ποσότητας του δείγματος και της ποσότητας της εκχυλιστικής φάσης, μειώνοντας έτσι το συνολικό κόστος. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της μεθόδου μικροεκχύλισης είναι η επιτάχυνση μεταφοράς της μάζας κατά την διαδικασία της ρόφησης και της εκρόφησης στο αναλυτικό όργανο, ενώ ταυτόχρονα εμποδίζει την έμφραξη του αναλυτικού οργάνου από προσμίξεις^[5-7].

Ο όρος μικροεκχύλιση περιλαμβάνει μία ομάδα διαφορετικών τεχνικών όπως την μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase MicroExtraction, SPME) και την μικροεκχύλιση υγρής φάσης (Liquid Phase Microextraction, LPME). Η εμφάνιση της Μικροεκχύλισης Στερεής Φάσης^[8] το 1990 αποτέλεσε σημείο αναφοράς στην εξέλιξη των τεχνικών εκχύλισης. Η επακόλουθη βιομηχανική διάδοση της SPME τεχνικής σηματοδότησε την απαρχή μιας έντονης ερευνητικής δραστηριότητας στο πεδίο αυτό. Με το πέρασ ορισμένων ετών, προτάθηκε στη βιβλιογραφία και η μικροεκχύλιση με διαλύτη, γνωστή και ως Μικροεκχύλιση Υγρής Φάσης (Liquid-Phase Microextraction - LPME)^[9-10].

1.2.1 Μέθοδος μικροεκχύλισης υγρής φάσης, LPME

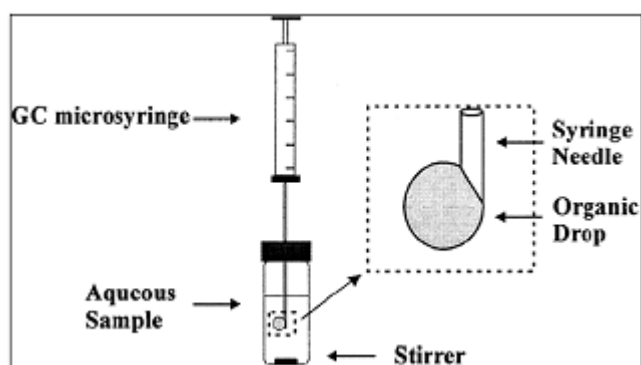
Η μέθοδος μικροεκχύλισης υγρής φάσης αποτελεί ουσιαστικά μικρογραφία της κλασικής μεθόδου προετοιμασίας δειγμάτων υγρή-υγρή εκχύλιση, η οποία επιτυγχάνεται με μείωση της αναλογίας της οργανικής και της υδατικής φάσης. Η LPME είναι γρήγορη και απλή, ενώ το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της είναι η αποκατάσταση της ισορροπίας εντός μερικών λεπτών, αυξάνοντας έτσι την ακρίβεια και την ευαισθησία της μεθόδου ενώ παράλληλα είναι φιλική προς το περιβάλλον. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή μειώνει το συνολικό χρόνο προσδιορισμού του συντελεστή κατανομής οκτανόλης/νερού. Παρά τις διάφορες τεχνικές μικροεκχύλισης που έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία, η καινοτομία της LPME τεχνικής συνδυάζει ταχύτητα, απλότητα, χαμηλό κόστος και είναι φιλική προς το περιβάλλον. Επιπλέον, με τις τεχνικές αυτές καθίσταται πλέον δυνατή η ανάλυση ρυπαντών σε πραγματικά περιβαλλοντικά δείγματα όπου συνήθως απαντούν σε ίχνη^[3].

Παρόλα τα πλεονεκτήματα της μεθόδου LPME έχει παρατηρηθεί ότι δεν είναι πολύ ισχυρή μέθοδος εξαιτίας των προβλημάτων που σχετίζονται με την αστάθεια της μικροσταγόνας. Τα προβλήματα αυτά επικεντρώνονται σε πολύ υψηλούς ρυθμούς ανάδευσης αλλά κυρίως σε διάφορες πολύπλοκες περιβαλλοντικές μήτρες οι οποίες έχουν επιβλαβείς επιδράσεις στη σταθερότητα της σταγόνας του διαλύτη^[11].

Η συνεχής έρευνα πάνω στην τεχνική της LPME οδήγησε στην δημιουργία πολλών, γενικά, παραλλαγών της μεθοδολογίας που στοχεύουν στην βελτίωση της και κυρίως αφορούν τον τρόπο διάσπασης της μικροσταγόνας. Παραδείγματα αποτελούν οι παρακάτω τεχνικές:

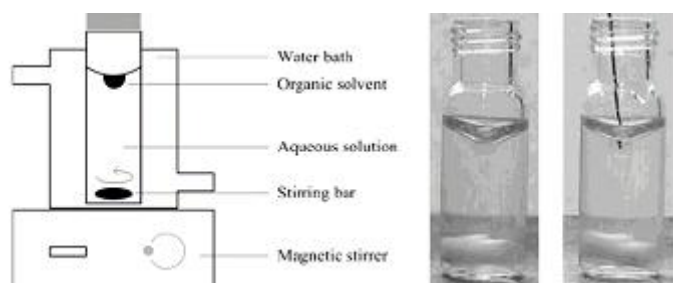
© Μία κατηγορία της μεθόδου LPME βασίζεται στη μικροεκχύλιση μονής σταγόνας όπου η φάση εκχύλισης είναι μία σταγόνα ενός μη αναμίξιμου με το νερό διαλύτη αιωρούμενη σε υδατικό διάλυμα για την εκχύλιση των ζητούμενων ενώσεων

από υδατικά δείγματα η οποία ονομάστηκε **Μικροεκχύλιση Μονής Σταγόνας (Single – Drop MicroExtraction, SDME)**^[5].



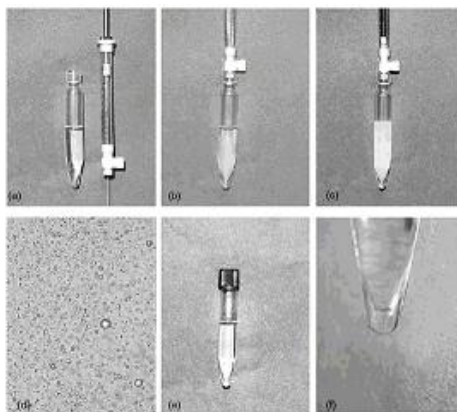
Εικ. 1.4. Σχηματική παράσταση της SDME^[5].

☺ **Μικροεκχύλιση Απευθείας Αιωρούμενου Σταγονιδίου (Directly Suspended Droplet Microextraction, DSDME)**^[14] είναι η πρώτη προσέγγιση που ακολούθησε τη μέθοδο SDME όπου η ανάδευση του μίγματος που περιείχε το υδατικό δείγμα και την οργανική φάση δέκτη παράγει ένα συμμετρικά περιστρεφόμενο πεδίο γύρω από τον συμμετρικό άξονα του μικρο-σταγονιδίου. Παρά το γεγονός ότι η μικροσταγόνα αφήνεται ελεύθερη, εξακολουθεί να υφίσταται στη μορφή μονής σταγόνας. Με την παρέλευση ενός προκαθορισμένου χρονικού διαστήματος η οργανική φάση δέκτης απομακρύνεται με τη βοήθεια μικρο-σύριγγας και στη συνέχεια χρησιμοποιείται για ανάλυση.



Εικ. 1.5. Σχηματική απεικόνιση της DSDME: η πειραματική διάταξη, η εκχύλιση και η ανάκτηση της μικροσταγόνας για περαιτέρω ανάλυση^[14].

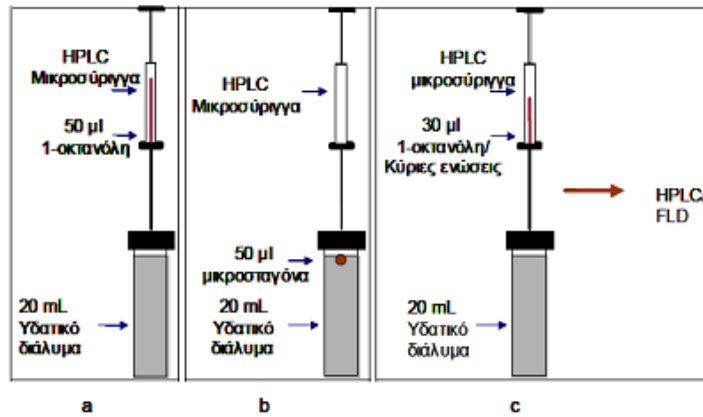
☺ **Υγρή – Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME)**^[15] κατά την οποία ένας διαλύτης διασκορπίσματος μη υδατοδιαλυτός καθώς και μία οργανική φάση, εκχύνονται στο διάλυμα δημιουργώντας ένα θολό διάλυμα με αποτέλεσμα την αύξηση της διεπιφάνειας οργανικού διαλύτη/νερού



Εικ. 1.6 Τα στάδια της DLLME, a) πριν την εισαγωγή του μίγματος του διαλύτη διασποράς και του διαλύτη εκχύλισης μέσα στο διάλυμα, b) έναρξη της εισαγωγής του μίγματος των διαλυτών, c) ολοκλήρωση της εισαγωγής των διαλυτών, d) μεγέθυνση στην οποία φαίνονται τα σωματίδια των διαλυτών διασποράς και εκχύλισης σε νεφελώδη κατάσταση, e) μετά την φυγοκέντρωση και f) μεγενθυμένη εικόνα της φάσης που καθιζάνει^[15].

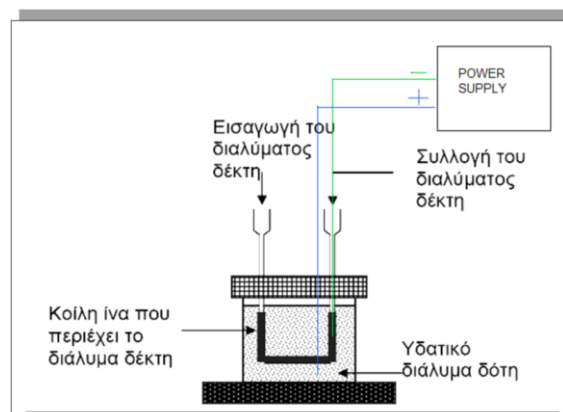
☺ **Υγρή – Υγρή Μικροεκχύλιση με χρήση υπερήχων (Ultrasound – Assisted Liquid-Liquid Microextraction, UALLME)** η οποία χρησιμοποιεί τους υπέρηχους ώστε η οργανική μικροσταγόνα να διασπαστεί πλήρως^[12].

☺ Η μέθοδος μικροεκχύλισης που χρησιμοποιεί το vortex για την αύξηση της συνολικής διεπιφάνειας οκτανόλης/νερού ονομάζεται **Vortex – Assisted Liquid – Liquid Microextraction, VALLME**. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή η ουσία εκχυλίζεται από την υδατική φάση κατευθείαν μέσα στην οργανική φάση. Η μέθοδος αυτή αποδείχτηκε ένα γρήγορο, απλό και ευαίσθητο μέσο προσυγκέντρωσης προκειμένου για την ανάλυση ενώσεων που απαντούν σε ίχνη^[13].



Εικ. 1.7. Σχηματική παράσταση της τεχνικής VALLME: a) πριν την εισαγωγή της μικροσταγόνας, b) εισαγωγή μικροσταγόνας c) ανάκτηση της σταγόνας μετά την ανάδευση /φυγοκέντρωση του μίγματος^[13].

☺ **Hollow Fiber-LPME** είναι μία τεχνική μικροεκχύλισης υγρής-υγρής φάσης και αποτελεί μία εξέλιξη της μεθόδου EME (Electromembrane MicroExtraction) καθώς η κινητήρια δύναμη μεταφοράς των ρύπων από το διάλυμα-δότη στο διάλυμα-δέκτη μέσω της μεμβράνης είναι η διαφορά δυναμικού^[11].



Εικ. 1.8 Σχηματική απεικόνιση της Hollow Fiber-LPME^[13].

2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ

(SOLID PHASE MICROEXTRACTION – SPME)

2.1 Εισαγωγικά

Η τεχνική της SPME είναι μία νέα σχετικά μέθοδος προετοιμασίας δείγματος που όμως πολύ γρήγορα διαδόθηκε στον επιστημονικό χώρο καθώς είναι πολύ αποτελεσματική. Είναι μία τεχνική εκχύλισης που βασίζεται στην ρόφηση των αναλυτών από την στερεή φάση εκχύλισης η οποία ξεπερνά πολλούς από τους περιορισμούς των συμβατών τεχνικών προετοιμασίας δείγματος^[8,16].

Η τεχνική αυτή γνωστοποιήθηκε από τους J. Pawliszyn και την επιστημονική του ομάδα στο Πανεπιστήμιο του Waterloo (Ontario, Canada) το 1989, και σήμερα είναι κοινώς αποδεκτή, με συνεχώς αυξανόμενες βιβλιογραφικές αναφορές. Στην πραγματικότητα το 1989 εκδόθηκαν οι αρχές της θεωρίας που βασίζεται η SPME και το 1990 έγινε πραγματικότητα η δημιουργία της πρώτης συσκευής SPME. Η εφεύρεση της SPME βασίζεται στη τεχνολογία των ανοικτού-σωληνοειδή τύπου τριχοειδών στήλων (open-tubular capillary columns) που χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία (GC) η οποία εμφανίστηκε στην δεκαετία του '80^[17].

Η Supelco (τόρα Sigma Aldich) εμπορευματοποίησε την συσκευή της SPME για πρώτη φορά το 1993 . Ο σχεδιασμός της εμπορικά διαθέσιμης συσκευής βασίστηκε σε μία επαναχρησιμοποιούμενη μικροσύριγγα που συνδεόταν με μία ίνα από τηγμένο διοξείδιο του πυριτίου (fused silica) και καλύπτεται από υμένιο υγρού πολυμερικού υλικού το οποίο είναι είτε πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS) είτε πολυακρυλικό (PA)^[18].

Η SPME ορίζεται μία μέθοδος εκχύλισης όπου ο όγκος της εκχυλιζόμενης φάσης είναι πολύ μικρός σε σχέση με τον όγκο του δείγματος και βασίζεται στις αρχές της ισορροπίας με αποτέλεσμα να μην προκαλεί την εξαντλητική εκχύλιση των ενώσεων-στόχων από το δείγμα. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί εμπορικά διαθέσιμες ίνες πάνω στην επιφάνεια των οποίων βρίσκεται το ροφητικό υλικό (στατική φάση ή φάση εκχύλισης). Με την πάροδο καθορισμένου χρονικού διαστήματος επέρχεται ισορροπία στην κατανομή των ενώσεων-στόχων μεταξύ του δείγματος και της εκχυλιζόμενης φάσης, οι συνθήκες μετάδοσης θερμότητας με μεταγωγή δεν επηρεάζουν το ποσοστό εκχύλισης, το οποίο πρακτικά είναι σταθερό μέσα στα όρια του πειραματικού λάθους και είναι ανεξάρτητο από την περαιτέρω αύξηση του χρόνου εκχύλισης. Αν η εκχύλιση διακοπεί πριν επιτευχθεί η ισορροπία μεταξύ του δείγματος και της εκχυλιζόμενης φάσης, τότε το ποσό της προς ανάλυση ουσίας που εκχυλίζεται είναι ανάλογο του χρόνου και η ποσοτικοποίηση μπορεί να παρουσιαστεί βασισμένη στην χρονική συγκέντρωση των προς ανάλυση ουσιών οι οποίες έχουν εκχυλιστεί από την επικάλυψη της ίνας^[16-18].

Η SPME αναπτύχθηκε για την επίτευξη γρήγορης προετοιμασίας δειγμάτων, που αποτελεί πρώτη ανάγκη, τόσο σε εργαστηριακή κλίμακα, όσο και σε *in situ* εφαρμογές. Αποτελεί μία σμίκρυνση της μεθόδου SPE γεγονός που οδηγεί στην ελαχιστοποίηση της ανάλυσης δηλαδή στην απαίτηση μικρότερων ποσοτήτων δείγματος. Συγκεντρώνει πολλά **πλεονεκτήματα** καθώς είναι μία τεχνική απλή και εύχρηστη, χαμηλού κόστους, η οποία δύναται να αυτοματοποιηθεί, δεν προϋποθέτει την χρήση διαλύτη και επιταχύνει την μεταφορά μάζας κατά την διάρκεια της εκχύλισης και της εκρόφησης. Επίσης, ολοκληρώνεται σε ένα στάδιο ενώ δεν απαιτεί στάδιο καθαρισμού εφόσον διακρίνεται από υψηλή επιλεκτικότητα και οι πιθανές προσμίξεις εξαφανίζονται κατά την εκρόφηση στο αναλυτικό όργανο, αποφεύγοντας

έτσι την απώλεια μέρους της ποσότητας των ενώσεων-στόχων οδηγώντας σε μία τεχνική υψηλής ευαισθησίας. Τέλος, είναι μία αναλυτική μέθοδος που εφαρμόζεται για την ανίχνευση μεγάλης ποικιλίας αναλυτών από πολλές και διαφορετικές μήτρες, εμφανίζοντας ταυτόχρονα χαμηλά όρια ανίχνευσης και υψηλή ακρίβεια. Η SPME είναι ακόμη φιλική προς το περιβάλλον^[6,7,16-19].

Φυσικά η τεχνική της SPME διαθέτει ταυτόχρονα αρκετά **μειονεκτήματα** όπως το γεγονός ότι παρ' όλες τις προσπάθειες η αντίσταση μεταφοράς της μάζας από το δείγμα στην ίνα παραμένει. Ένα σημαντικό μειονέκτημα αποτελεί ο περιορισμένος χρόνος ζωής της ίνας καθώς παρατηρούνται φθορές στην επιφάνειά της λόγω της ανάδευσης ή της υψηλής θερμοκρασίας κατά την εκρόφιση ή της έκθεσης της ίνας σε πολύπλοκες μήτρες με πολλές προσμίξεις. Η μερική απώλεια της στατικής φάσης έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κορυφών που συνενώνονται μαζί με τις προσδιοριζόμενες ουσίες, μειώνοντας έτσι την ακρίβεια και την ευαισθησία της τεχνικής. Επίσης, ορισμένες φορές ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους προσδένονται ανέκκλητα με την ίνα αλλάζοντας τα χαρακτηριστικά του υλικού επικάλυψης της ίνας με τέτοιο τρόπο ώστε να μη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά. Ακόμη, η εφαρμογή της SPME περιορίζεται από το μικρό όγκο της φάσης εκχύλισης καθώς εξάγεται μικρή σχετικά ποσότητα από την αρχική συγκέντρωση των αναλυτών στο δείγμα. Τέλος, τα περισσότερα προβλήματα σε αυτή τη μέθοδο δημιουργούνται όταν η μήτρα είναι πολύ βρώμικη κάτι που οδηγεί σε χαμηλή επαναληψιμότητα και μειωμένη γραμμικότητα για χαμηλές συγκεντρώσεις αναλυτών. Παρόλα αυτά δεν παύει να είναι μία τεχνική εξαιρετική η οποία εξελίσσεται και βελτιώνεται συνεχώς^[6,7,16-19].

2.2 Θεωρία SPME

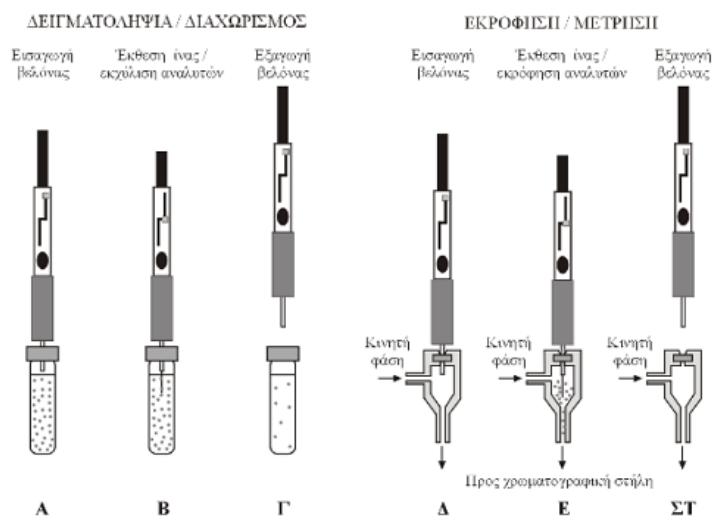
Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε για να καλύψει την ανάγκη ταχείας δειγματοληψίας και προετοιμασίας δείγματος, τόσο στο εργαστήριο, όσο και στον χώρο δειγματοληψίας. Η τεχνική αυτή συνίσταται από δύο στάδια^[7,17]:

α) το στάδιο **δειγματοληψίας/εκχύλισης** και β) το στάδιο της **εκρόφησης/μέτρησης**.

Κατά το στάδιο της **δειγματοληψίας/εκχύλισης** αρχικά η ίνα βρίσκεται μέσα στην σύριγγα μικρο-εκχύλισης στερεής φάσης (SPME fiber holders) για προστασία, στη συνέχεια η σύριγγα (με την ίνα μέσα της) διαπερνά το ελαστικό διάφραγμα-πόμα (septum: συνήθως από ελαστικό σιλικόνης) του φιαλιδίου με το δείγμα (**Εικ. 2.1.A**), ακολουθεί την κίνηση του εμβόλου προς τα κάτω και η ίνα εξάγεται από τη σύριγγα και βυθίζεται στο διάλυμα για δειγματοληψία/εκχύλιση μη πτητικών ουσιών ή παραμένει στην υπερκείμενη φάση (headspace) για δειγματοληψία/ εκχύλιση πτητικών ουσιών για ορισμένο χρονικό διάστημα (**Εικ. 2.1.B**). Μετά το πέρας του καθορισμένου χρόνου δειγματοληψίας η ίνα επανεισάγεται στη σύριγγα μικρο-εκχύλισης στερεής φάσης (SPME fiber holders) για προστασία, με κίνηση του εμβόλου προς τα επάνω και η σύριγγα εξέρχεται από τη φιάλη δειγματοληψίας (**Εικ. 2.1.Γ**). Στη συνέχεια είτε θα αποθηκευτεί για μικρό χρονικό διάστημα καθώς έχει την δυνατότητα αυτή είτε θα προχωρήσει η διαδικασία στο δεύτερο στάδιο.

Κατά το στάδιο της **εκρόφησης/μέτρησης** η σύριγγα με την ίνα στο εσωτερικό της διαπερνά το ελαστικό διάφραγμα (septum) του εισαγωγέα δείγματος της αέριας ή υγρής χρωματογραφίας (**Εικ. 2.1.Δ**) και στη συνέχεια εξάγεται η ίνα στο εσωτερικό του εισαγωγέα (**Εικ. 2.1.E**), οπότε πραγματοποιείται η εκρόφηση των αναλυτών για συγκεκριμένο χρόνο. Τέλος, η ίνα εισέρχεται πάλι εντός της ένεσης SPME και εξάγεται από τον εισαγωγέα του της αέριας ή υγρής χρωματογραφίας (**Εικ. 2.1.ΣΤ**). Οι αναλύτες παρασύρονται από την κινητή φάση προς τη

χρωματογραφική στήλη για χρωματογραφικό διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση. Μετά την εξαγωγή της από τον εισαγωγέα, η ίνα είναι έτοιμη για την επόμενη δειγματοληψία, δεν χρειάζεται επιπλέον στάδιο καθαρισμού.



Εικ. 2.1. Διαδικασία δειγματοληψίας με την SPME^[7].

Η εκχύλιση με την τεχνική SPME βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ της υδατικής φάσης και της στατικής φάσης του πολυμερούς. Τυπικά η εκχύλιση με την τεχνική SPME θεωρείται ότι τελειώσει όταν η συγκέντρωση του αναλύτη έχει φτάσει σε ισορροπία μεταξύ της μήτρας του δείγματος και του πολυμερούς της ίνας. Αυτό σημαίνει ότι όταν επέλθει ισορροπία το ποσό του αναλύτη που εκχυλίζεται είναι σταθερό, μέσα στα όρια του πειραματικού σφάλματος, και ανεξάρτητο του επιπλέον χρόνου εκχύλισης. Οι συνθήκες ισορροπίας μετά την εισαγωγή της φάσης εκχύλισης έχουν μελετηθεί και η δυναμική της απορρόφησης περιγράφεται μαθηματικά από την παρακάτω σχέση^[20,21]:

$$n = \frac{k_{fs} V_f V_s C_o}{k_{fs} V_f + V_s}$$

όπου

n : ο αριθμός των γραμμομορίων που εκχυλίζονται από την επικάλυψη της ίνας στην ισορροπία

K_{fs} : η σταθερά κατανομής της επικάλυψης της ίνας προς το δείγμα

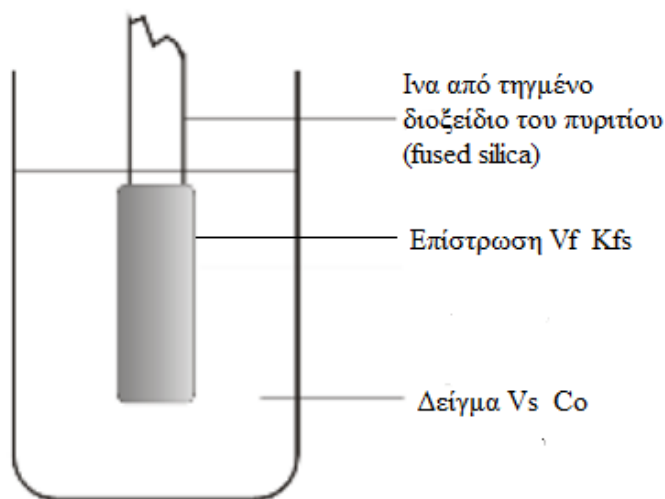
V_f : ο όγκος επικάλυψης της ίνας

V_s : ο όγκος του δείγματος

C_0 : η αρχική συγκέντρωση της προς ανάλυση ουσίας στο δείγμα.

Η εξίσωση αυτή αναφέρεται κυρίως σε υγρά περιβλήματα ινών όπως το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS) αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για στερεές επιστρώσεις για μικρές όμως συγκεντρώσεις αναλυτών, ώστε να μην επέλθει κορεσμός της πορώδους επίστρωσης. Επίσης προϋποθέτει ότι το διάλυμα είναι ομοιογενές και ότι δεν υπάρχει διαφυγή αναλυτών στην αέρια φάση^[21].

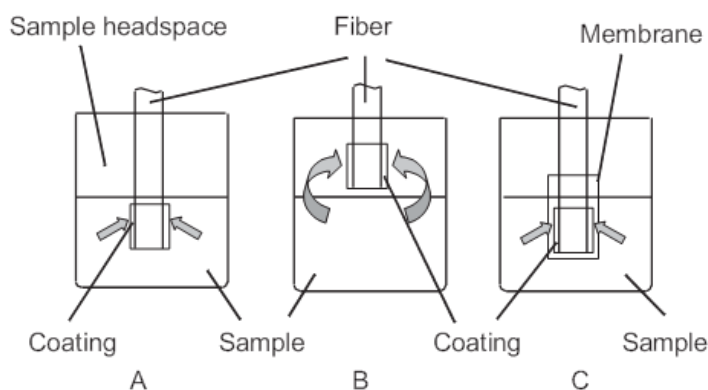
Η τεχνική αυτή επιτρέπει την επίτευξη ορίων ανίχνευσης της τάξης των 5-50 ng/L (ppt) για πτητικά και ημι-πτητικά συστατικά με καλή γραμμικότητα και ευαισθησία. Έχει χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση πλήθους ενώσεων με επιτυχία και είναι μία τεχνική που θα απασχολήσει αρκετά και στο μέλλον. Οι πρώτες συσκευές για την τεχνική βασίζονταν σε μια απλή τροποποίηση εμπορικών μικροσυρίγγων εισαγωγής δειγμάτων (μέχρι λίγων μL) σε χρωματογράφους με ενσωμάτωση σε αυτές πολυμερών ινών. Μια τυπική απεικόνιση μιας εμπορικής συσκευής SPME φαίνεται στην **Εικ. 2.2**.^[6]



Εικ. 2.2. Μικροεκχύλιση με την τεχνική SPME (όπου Kfs ο συντελεστής κατανομής μεταξύ της υδατικής και στατικής φάσης, Vs και Vf είναι ο όγκος του δείγματος και της ίνας αντίστοιχα και Co είναι η αρχική συγκέντρωση του αναλύτη στο διάλυμα)^[17].

2.2.1 Τρόποι εφαρμογής της SPME

Η ίνα της SPME διαθέτει τρεις δυνατούς τρόπους εφαρμογής της κατά την δειγματοληψία: **1.** απευθείας εμβάπτιση στη μήτρα (**Εικ. 2.3.A**), **2.** τοποθέτηση στην υπερκείμενη φάση (**Εικ. 2.3.B**) και **3.** χρήση προστατευτικής μεμβράνης (**Εικ. 2.3.C**)^[17].



Εικ. 2.3. Τρόποι εφαρμογής της ίνας κατά την διάρκεια της SPME^[17].

Απευθείας SPME: Η ίνα βυθίζεται μέσα στο δείγμα και οι ουσίες μεταφέρονται απευθείας από την μήτρα του δείγματος στο υλικό επικάλυψης. Οι αναλύτες μεταφέρονται απευθείας από την μήτρα στην ίνα και ο χρόνος που

απαιτείται για την αποκατάσταση της ισορροπίας μειώνεται αισθητά με χρήση τεχνικών ανάδευσης. Εφαρμόζεται στην περίπτωση ανίχνευσης μη πτητικών ουσιών^[7,17].

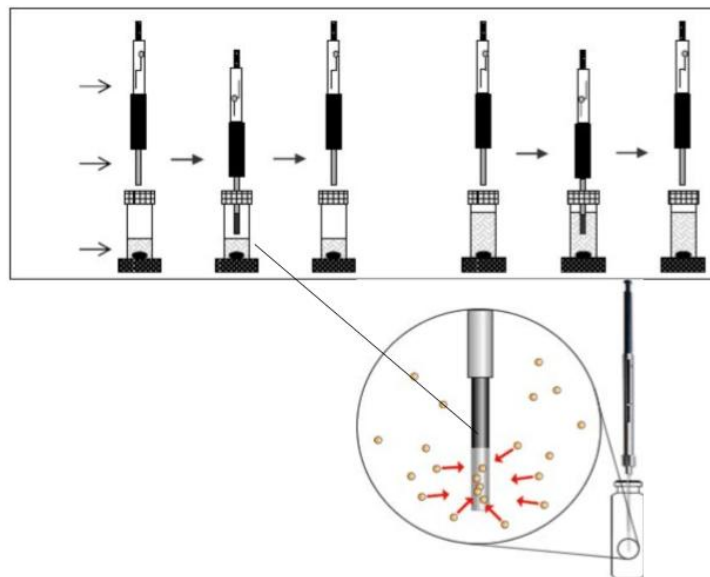
SPME με τη χρήση προστατευτικής μεμβράνης: Η προστατευτική μεμβράνη από ειδικό πολυμερές χρησιμοποιείται στην περίπτωση βρώμικων και πολύπλοκων υποστρωμάτων. Η μεμβράνη παρέχει επιπλέον προστασία στην ίνα και αυξάνει την επιλεκτικότητά της. Αποτελεί φράγμα έναντι των καταστροφικών μεγαλομορίων (χουμικά οξέα) καθυστερώντας την φθορά της ίνας. Η εκχύλιση γίνεται όπως και στην απευθείας SPME όμως απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο για την αποκατάσταση της ισορροπίας καθώς οι αναλύτες πρέπει πρώτα να διαπεράσουν την μεμβράνη και έπειτα να ροφηθούν από την ίνα. Αυτός ο τρόπος SPME προτιμάται όταν οι ενώσεις-στόχοι χαρακτηρίζονται από υψηλά σημεία ζέσεως^[7,17].

SPME από την υπερκείμενη φάση του δείγματος: Η ίνα εκτίθεται στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος. Οι ουσίες μεταφέρονται από το δείγμα στην αέρια φάση και στη συνέχεια στην ίνα γεγονός που αυξάνει το συνολικό χρόνο ισορροπίας. Χρησιμοποιείται στην περίπτωση πτητικών κυρίως ουσιών. Συνήθως με αυξημένη θερμοκρασία εκχύλισης, εφαρμογής ανάδευσης αλλά και άλλων τεχνικών μειώνεται ο χρόνος ισορροπίας ενώ η ικανότητα εκχύλισης της μεθόδου αυτής επεκτείνεται και σε ουσίες μέτριας πτητικότητας^[7,17]. **Η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί** καθώς η ίνα προστατεύεται από πιθανή καταστροφή λόγω του υποστρώματος του δείγματος και της μεταφοράς σε αυτήν μη πτητικών μεγαλομορίων. Επιτρέπει, επίσης, την αλλαγή παραμέτρων της μήτρας του δείγματος, όπως είναι το pH, χωρίς να υπάρχει κίνδυνος αλλοίωσης του υλικού επικάλυψης της ίνας.

Η παραλαβή των πτητικών συστατικών από την υπερκείμενη αέρια φάση του δείγματος πλεονεκτεί έναντι της παραλαβής απευθείας από το δείγμα γιατί

αποτρέπεται η προσρόφιση μη πτητικών συστατικών υψηλού μοριακού βάρους στην ίνα με συνέπεια να αυξάνεται η διάρκεια ζωής της. Η τεχνική SPME τα τελευταία χρόνια έχει βρει πλήθος εφαρμογών σε διάφορα συστήματα όπως τροφίμων, βιολογικών και περιβαλλοντικών δειγμάτων που θεωρούνται πολύπλοκα συστήματα. Η μέθοδος SPME προσυγκεντρώνει τις ενώσεις δίχως να έρχεται σε επαφή με την μήτρα η οποία πιθανότατα να περιέχει χουμική ύλη η οποία δημιουργεί πολλές παρεμβολές κατά την ανάλυση. Έτσι λοιπόν, η τεχνική SPME παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα είναι εύκολη και γρήγορη σχετικά ενώ παράλληλα προστατεύει την ίνα από γρήγορη φθορά, με αποτέλεσμα να παρατείνεται ο χρόνος ζωής της και να μειώνεται ακόμα περισσότερο το κόστος της μεθόδου ενώ επιπρόσθετα αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου.

Η συγκεκριμένη μέθοδος της SPME περιορίζεται όταν οι ενώσεις-στόχοι είναι ημιπτητικές καθώς εμφανίζεται δυσκολία στην μεταφορά μάζας από την μήτρα στην υπερκείμενη φάση. Αυτό το φράγμα στη μεταφορά των αναλυτών εξαρτάται από τον συντελεστή διάχυσης των αναλυτών προς την υπερκείμενη φάση και επιδρά στον χρόνο εκχύλισης. Οι συνεχείς έρευνες για βελτίωση της τεχνικής όπως μέσω ανάδευσης, ή αύξησης θερμοκρασίας στοχεύουν στην μείωση αυτού του φράγματος και στην επέκταση της μεθόδου σε ενώσεις στόχους.



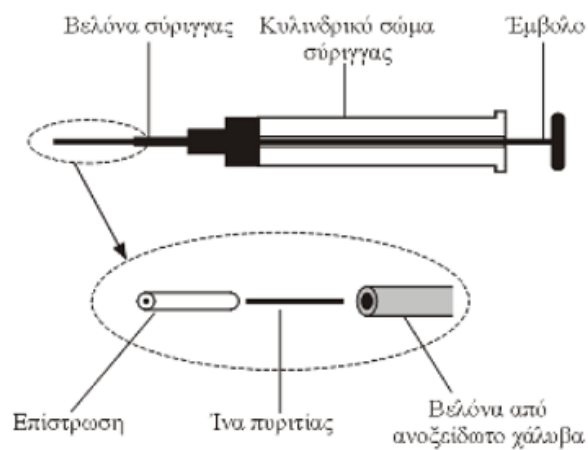
Εικ. 2.4. Εφαρμογή SPME δειγματοληψίας με δύο διαφορετικούς τρόπους: Παραλαβή συστατικών από το εσωτερικό διάκενο του φιαλιδίου (αριστερά) & Παραλαβή πτητικών συστατικών από το υγρό δείγμα (δεξιά)^[18].

2.2.2 Παράμετροι επίδρασης στην αποτελεσματικότητα της SPME

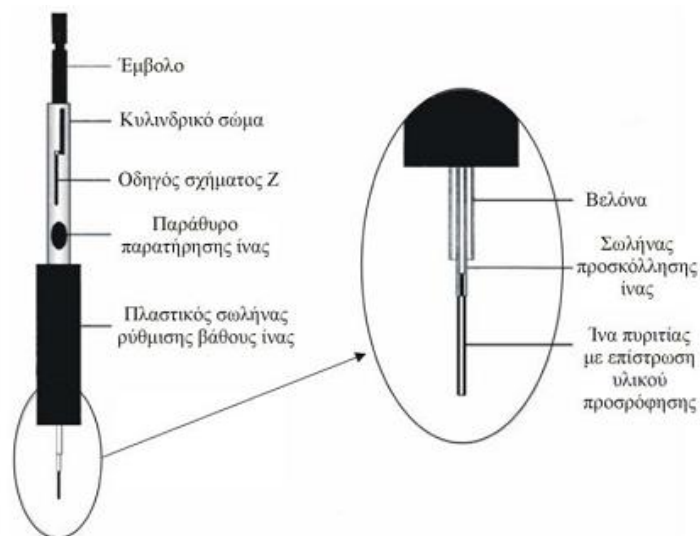
Η τεχνική αυτή της SPME επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες οι οποίοι κατά την βελτιστοποίηση της μεθόδου ελέγχονται, αν όχι όλοι αρκετοί, με στόχο την αύξηση της ευαισθησίας της αναλυτικής μεθόδου. Η προσπάθεια αύξησης της ευαισθησίας οδήγησε στη διεκπεραίωση μίας σειράς τροποποιήσεων της SPME κατά την διερεύνηση των κατάλληλων συνθηκών μικροεκχύλισης. Η ικανότητα εκχύλισης μετρείται από την ποσότητα των αναλυτών που εκχυλίζεται από την στατική φάση και όπως είναι λογικό η ικανότητα της διαδικασίας εκχύλισης εξαρτάται από^[6,7,16-19]:

- τον τύπο του υλικού επικάλυψης της ίνας
- την τοποθεσία της ίνας
- τον χρόνο δειγματοληψίας και εκρόφησης
- τη θερμοκρασία δειγματοληψίας και εκρόφησης
- την ανάδευση του δείγματος

- την ιοντική ισχύ του διαλύματος (αναλόγως της προσδιοριζόμενης ουσίας)
- το pH του δείγματος
- το είδος των αναλυτών (πητικότητα, πολικότητα ενώσεων-στόχων)
- τον ολικό όγκο συστήματος (όγκος δείγματος και υπερκείμενη φάσης)
- την αρχική συγκέντρωση των αναλυτών στο δείγμα
- τη σταθερά κατανομής k_{fs} και τον συντελεστή διάχυσης D_f του εκάστοτε αναλύτη που μεταφέρεται από το δείγμα στο υλικό επικάλυψης της ίνας.



Εικ. 2.5. Εργαστηριακή συσκευή μικροεκχύλισης (SPME) με εμπορική μικροσύριγγα^[7].



Εικ. 2.6. Συσκευή μικροεκχύλισης (SPME)^[7].

3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΦΑΣΕΩΝ

3.1 Συντελεστής Λιποφιλίας ή Κατανομής οκτανόλης/νερού K_{ow} (ή P)

Ο λιποφιλικός ή όχι χαρακτήρας μίας ένωσης μας παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την περιβαλλοντική της συμπεριφορά (πιθανότητα ενσωμάτωσης ή πρόσληψης από οργανισμούς, προσρόφησης σε στερεά που περιέχουν οργανική ύλη, κα.). Ο λιποφιλικός χαρακτήρας μίας ένωσης μπορεί να προσεγγιστεί μέσω της τάσης της ένωσης να κατανέμεται μεταξύ οκτανόλης και νερού. Ως συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού K_{ow} μίας ένωσης A ορίζεται ο λόγος^[2]:

$$P \quad \text{ή} \quad K_{ow} = \frac{[A_{\text{οκτ.}}]}{[A_{\text{νερό}}]}$$

όπου, $[A_{\text{οκτ.}}]$ και $[A_{\text{νερό}}]$ οι συγκεντρώσεις της A στην οκτανόλη και στο νερό αντίστοιχα. **Όρος:** η συγκέντρωση $[A]$ να μην επηρεάζει την τιμή του K_{ow} . Οι μετρήσεις γίνονται σε $T = 20-25$ °C (επίδραση της θερμοκρασίας : $\pm 0,001-0,001 \log K_{ow} / ^\circ\text{C}$). **Παρατήρηση:** Ο K_{ow} δεν ισούται ακριβώς με τον λόγο της διαλυτότητας της A στην οκτανόλη προς την διαλυτότητά της στο νερό γιατί στο σύστημα οκτανόλης/νερού σε ισορροπία η οκτανόλη περιέχει 2,3 mol/L νερό και το νερό 4,5 10^{-3} mol/L οκτανόλη. **Επομένως, όσο μεγαλύτερη τιμή K_{ow} χαρακτηρίζει μία ένωση τόσο λιγότερο διαλύεται στο νερό καθώς διαθέτει αυξημένο λιποφιλικό χαρακτήρα.**

3.2 Σταθερά του Henry-Μεταφορά οργανικών ενώσεων μεταξύ υδάτων και ατμόσφαιρας

Η ανταλλαγή των οργανικών ενώσεων μεταξύ υδάτων και ατμόσφαιρας αποτελεί μία διεργασία κλειδί που επηρεάζει σημαντικά το γίνεσθαι τους στο περιβάλλον και μπορεί να προσομοιωθεί από ένα κλειστό σύστημα στο οποίο υπάρχει υδατική φάση και υπερκείμενη αέρια φάση όπως το σύστημα της HSSPME. Η κατανομή μιας οργανικής ένωσης σε ένα σύστημα αποτελούμενο από μια αέρια και μια υδατική φάση σε ισορροπία, περιγράφεται από το συντελεστή κατανομής αέρας-νερό, ο οποίος είναι πιο γνωστός και ως σταθερά του νόμου του Henry K_H ^[22]. Θεωρητικά, ως σταθερά Henry ορίζεται ο λόγος της συγκέντρωσης μιας ένωσης στην αέρια φάση προς την συγκέντρωση αυτής στην υδατική φάση, υπό συνθήκες ισορροπίας. Η συγκέντρωση των ενώσεων στην αέρια και στην υδατική φάση δίνονται συνήθως υπό τη μορφή της μερικής πίεσης P_i (atm) και της μοριακότητας C_w ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), αντίστοιχα, και συνεπώς η σταθερά Henry (σε $\text{atm}\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$) θα υπολογίζεται από την σχέση^[2]:

$$K_H = \frac{P_i}{C_w}$$

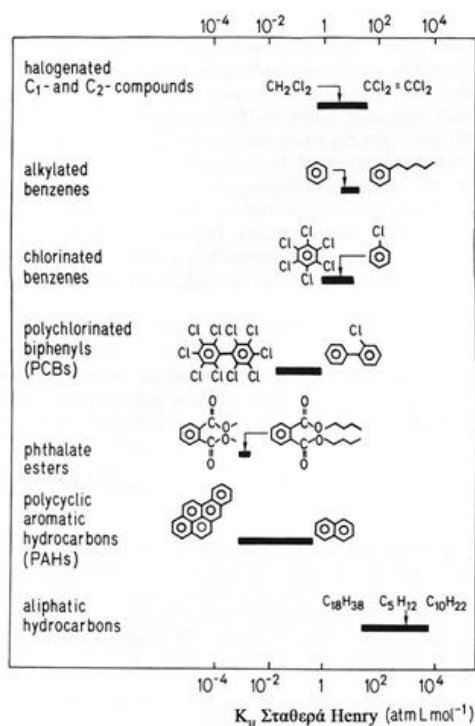
Αν η συγκέντρωση της ένωσης στην αέρια φάση (C_a) εκφράζεται επίσης χρησιμοποιώντας τη μοριακότητα (σε $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), τότε λαμβάνεται η λεγόμενη «αδιάστατη» σταθερά Henry (K'_H)^[2]:

$$K'_H = \frac{C_a}{C_w}$$

Η σταθερές K_H και K'_H σχετίζονται άμεσα μεταξύ τους, αν λάβουμε υπόψη το νόμο των ιδανικών αερίων για την μετατροπή της μερικής πίεσης της ένωσης στην ατμόσφαιρα (σε atm) σε συγκέντρωση (σε $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) [$P_i=(n_i/V)RT \Rightarrow P_i=C_aRT$]^[2]:

$$K'_H = \frac{K_H}{RT}$$

Ανεξάρτητα από τον τύπο που χρησιμοποιείται, η σταθερά Henry δείχνει πόσο μεγαλύτερη είναι η τάση διαφυγής (fugacity) της ένωσης όταν αυτή υφίσταται υπό τη μορφή αερίου, σε σχέση με την αντίστοιχη τάση διαφυγής της ένωσης όταν αυτή υφίσταται διαλυμένη στο νερό. Στην **Εικ. 3.1** φαίνεται το εύρος των τιμών που λαμβάνει η σταθερά Henry για διάφορες κατηγορίες ενώσεων. Η σταθερές Henry των οργανικών ενώσεων μπορεί να διαφέρουν μέχρι και 7 τάξεις μεγέθους και κυμαίνονται συνήθως μεταξύ 10^{-3} ως $10^4 \text{ atm}\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$. Είναι κατανοητό ότι οι ενώσεις που παρουσιάζουν μεγάλη πτητικότητα και χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, θα έχουν υψηλή σταθερά K_H και θα έχουν την τάση να μεταφέρονται από την υδατική στην αέρια φάση^[2,22].



Εικ. 3.1. Εύρος τιμών της σταθεράς Henry για διάφορες κατηγορίες ενώσεων.

4^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΟΛΥΚΥΚΛΙΚΟΙ ΑΡΩΜΑΤΙΚΟΙ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ (ΠΑΥ)

4.1 Δομή των ΠΑΥ

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται από συγχωνευμένους βενζολικούς δακτυλίους. Όταν ένα ζευγάρι ατόμων άνθρακα είναι κοινό, τότε οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι που διανέμονται από κοινού θεωρούμε ότι είναι συγχωνευμένοι. Η τελική δομή είναι ένα μόριο, όπου όλα τα άτομα άνθρακα και υδρογόνου βρίσκονται σε ένα επίπεδο. Έτσι προκύπτει μια ποικιλία ενώσεων μεταξύ του ναφθαλενίου ($C_{10}H_8$) και του κορονενίου ($C_{24}H_{12}$). Μεταξύ αυτών των ενώσεων υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ΠΑΥ, που διαφέρουν ως προς τον αριθμό και την θέση των αρωματικών δακτυλίων. Οι διαφοροποιήσεις ως προς τον αριθμό, την θέση και ενδεχομένως την χημεία των ατόμων που αντικαθιστούν άλλα άτομα, βασίζονται στο βασικό σύστημα δακτυλίων. Οι φυσικές και χημικές ιδιότητες των ΠΑΥ ποικίλλουν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Λόγω του τεράστιου ενδιαφέροντος που υπάρχει για τα ΠΑΥ, σχετικά με τις επιπτώσεις τους στο περιβάλλον και στον άνθρωπο, έχουν συμπεριληφθεί στις λίστες προτεραιότητας ρυπαντών που έχει συντάξει η ΕΡΑ (Environmental Protection Agency) των ΗΠΑ αλλά και η Ευρωπαϊκή Ένωση. Η ΕΡΑ έχει τοποθετήσει στην λίστα προτεραιότητας ρυπαντών 16 ΠΑΥ χωρίς υποκατάστατες, ως πολύ επικίνδυνων ενώσεων^[23,24].

4.2 Φυσικές ιδιότητες των ΠΑΥ

Όλοι οι ΠΑΥ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι στερεά χρώματος από άχρωμο σε απαλό και έντονο κίτρινο . Οι ΠΑΥ είναι λιγότερο πτητικοί από τους απλούς υδρογονάνθρακες και τα σημεία ζέσεώς τους είναι πολύ υψηλότερα από των n-

αλκανίων με τον ίδιο αριθμό ατόμων άνθρακα. Οι μεγάλες σχετικές μάζες καθώς και η έλλειψη πολικών υποκαταστατών στα μόρια τους, τους καθιστά δυσδιάλυτους στο νερό^[23,24].

Οι ΠΑΥ υψηλότερου μοριακού βάρους (> 3 αρωματικούς δακτυλίους) είναι σχετικά **αδρανή** λόγω του μεγάλου μοριακού όγκου τους. Επίσης, οι ενώσεις αυτές είναι λιγότερο διαλυτές στο ύδωρ, λιγότερο πτητικές και περισσότερο λιπόφιλες (Kow) σε αντίθεση με του χαμηλού μοριακού βάρους ΠΑΥ. Τα **χαρακτηριστικά διαλυτότητας** των ΠΑΥ ποικίλλουν ανάλογα με τον κάθε ΠΑΥ ξεχωριστά, αλλά σε γενικές γραμμές είναι^[23,24]:

- Η διαλυτότητα των ΠΑΥ στο νερό μειώνεται όσο αυξάνει το μοριακό βάρος.
- οι αλκυλο-υποκαταστάτες των αρωματικών δακτυλίων, (δηλαδή η αντικατάσταση ενός –H από μία CH₂-ομάδα) οδηγούν σε μείωση της διαλυτότητας της ένωσης, υπάρχουν κάποιες εξαιρέσεις στον κανόνα αυτό όπως το Βενζ[α]ανθρακένιο είναι λιγότερο διαλυτό σε σχέση είτε με το μεθυλο- είτε με το αιθυλβενζ[α]-ανθρακένιο.
- Όσο περισσότερα είναι τα κοινά άτομα των συγχωνευμένων βενζολικών δακτυλίων τόσο περισσότερο διαλυτή στο νερό είναι η ένωση ΠΑΥ, για παράδειγμα το ανθρακένιο είναι λιγότερο διαλυτό από το φαινανθρένιο.
- Η **τάση ατμών** του κάθε ΠΑΥ **καθορίζει την παραμονή του στο υδάτινο περιβάλλον**. Οι ΠΑΥ που διαθέτουν δύο και τρεις δακτυλίους είναι πτητικοί ενώ οι ΠΑΥ με περισσότερους από τέσσερις δακτυλίους είναι ημιπτητικοί υπό τις περιβαλλοντικές συνθήκες.

- Οι **πτητικοί ΠΑΥ** (π.χ. **ναφθαλένιο, ακεναφθυλένιο, ακεναφθένιο**) χαρακτηρίζονται από **μεγαλύτερες σταθερές Henry (K_H')** σε σχέση με τους ημιπτητικούς ΠΑΥ, και γι' αυτό **διαφεύγουν ευκολότερα προς την ατμόσφαιρα** και οι συγκεντρώσεις τους είναι πολύ πιο χαμηλές στο νερό σε σχέση με τους ημιπτητικούς.

Στο παρακάτω πίνακα 4.1 δίνονται οι σχετικές μοριακές μάζες (Mr), οι τάσεις ατμών, οι διαλυτότητες στο νερό, οι σταθερές Henry (K_H) και οι συντελεστές κατανομής οκτανόλης-νερού (K_{ow}), των τριών ΠΑΥ που μελετήθηκαν στην παρούσα έρευνα διότι αντιπροσωπεύουν τρεις κατηγορίες ενώσεων βάση της συμπεριφοράς τους μέσα στο σύστημα της SPME^[23,24,46]. Στην εικόνα 4.1 εμφανίζεται η χημική δομή των ενώσεων στόχων, του ναφθαλενίου, του φλουορενίου και του φλουορανθενίου.

Πίνακας 4.1. Φυσικά χαρακτηριστικά των ενώσεων στόχων

Compound	Molecular weight	Vapor pressure 25 °C (mmHg) ^a	K_H (atm m ³ mol ⁻¹) ^b	Log K_{ow}
Naphthalene	128.18	0.085	4.4×10^{-4}	3.30
Fluorene	166.22	0.0006	9.62×10^{-5}	4.18
Fluoranthene	202.26	9.22×10^{-6}	8.86×10^{-6}	5.16

^a 1 mmHg = 133.322 Pa.

^b 1 atm = 1.01×10^5 Pa.

4.3 Χημικές ιδιότητες των ΠΑΥ

Οι ΠΑΥ ταξινομούνται στις σχετικά αδρανείς ενώσεις, γεγονός που εξηγεί την ευρεία κατανομή τους στο περιβάλλον. Οι αντιδράσεις που δίνουν είναι κυρίως αντιδράσεις ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης και όχι προσθήκης γιατί υπάρχει η τάση διατήρησης των κυκλικών συζυγιακών συστημάτων^[23,24].

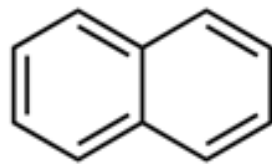
4.4 Πηγές ΠΑΥ

Οι ΠΑΥ εισάγονται στο περιβάλλον μέσω των φυσικών και ανθρωπογενών διαδικασιών. Οι κυριότερες φυσικές πηγές, μέσω των οποίων εισάγονται τα ΠΑΥ

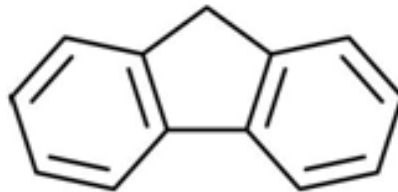
στην ατμόσφαιρα, είναι οι εκρήξεις ηφαιστειών, οι πυρκαγιές στα δάση και τα ορυκτά καύσιμα. Σημαντικές ανθρωπογενείς πηγές είναι η καύση φυσικών καυσίμων, η αποτέφρωση απορριμμάτων, η παραγωγή ασφάλτου και άνθρακα, η διύλιση του πετρελαίου, η παραγωγή αλουμινίου, ο εξευγενισμός του λαδιού και άλλες βιομηχανικές δραστηριότητες εξαιτίας ατελούς καύσης. Παρά την ύπαρξη πολλών ανθρωπογενών πηγών στις αστικές και βιομηχανικές περιοχές, τα ΠΑΥ απαντώνται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις σε αγροτικές και απομακρυσμένες περιοχές, λόγω της ικανότητας τους να μεταφέρονται σε πολύ μεγάλες αποστάσεις ως αέρια και αεροζόλ και λόγω της φαινόμενης αντοχή τους στην αποικοδόμηση τους στην ατμόσφαιρα. Γι' αυτόν τον λόγο οι εκπομπές των ΠΑΥ σε αστικές και βιομηχανικές περιοχές μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα των παράκτιων νερών καθώς και τα επιφανειακά νερά λιμνών και ποταμών^[25].

4.5 Τύχη των ΠΑΥ στο περιβάλλον

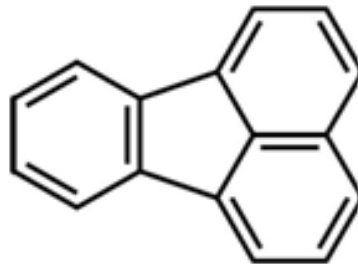
Η πλειοψηφία των ΠΑΥ εισέρχονται στην ατμόσφαιρα και εναποτίθενται στο έδαφος, σε υδάτινους όγκους και στη βλάστηση ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες τους. Μέσα στο περιβάλλον οι ΠΑΥ προτιμούν να προσροφηθούν στα σωματίδια του εδάφους, στα αιωρούμενα σωματίδια και τα ιζήματα του βυθού που υπάρχουν στο υδάτινο περιβάλλον παρά να διαλυθούν στο νερό λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα τους. Οι κύριες διεργασίες μέσα στο νερό στις οποίες συμμετέχουν τα ΠΑΥ είναι η διάλυση, εξάτμιση, προσρόφηση σε αιωρούμενα στερεά, ιζηματοποίηση, βιοτική και αβιοτική αποδόμηση, πρόσληψη από υδρόβιους οργανισμούς και συσσώρευση.



Ναφθαλένιο
(naphthalene)



Φλουορένιο
(fluorene)



Φλουορανθένιο
(fluoranthene)

Εικ. 4.1. Συντακτικός τύπος (χημική δομή) των ενώσεων-στόχων.

5^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΗ ΦΑΣΗ (HEADSPACE SOLID-PHASE MICROEXTRACTION, SPME)

5.1 Θεωρία

Η παρουσία της υπερκείμενης αέριας φάσης (headspace) πάνω από ένα υγρό δείγμα αναγκάζει τα πτητικά συστατικά του να μεταφερθούν στην υπερκείμενη αέρια φάση και η δειγματοληψία να πραγματοποιηθεί από αυτή την φάση και όχι μέσω απευθείας επαφής της ίνας με την μήτρα. Αυτή η μέθοδος μικρο-εκχύλισης στερεής φάσης υπό τις συνθήκες που έθεσε ο Pawliszyn (1997) οδηγεί σε μία μείωση της μάζας των ενώσεων προς ανάλυση στο πολυμερικό στρώμα της ίνας. Η μάζα των ενώσεων που εκχυλίζεται εξαρτάται κυρίως από τον **όγκο της υπερκείμενης αέριας φάσης** και από τους **λόγους κατανομής μεταξύ της φάσης ατμών και του υγρού δείγματος** καθώς επίσης και μεταξύ της φάσης αυτών και **του στρώματος πολυμερούς της ίνας**. Αυτές οι σχέσεις είναι αρκετά σύνθετες και παράγουν τις εξαρτήσεις της μάζας της διαλυμένης ουσίας που εκχυλίζεται σε σχέση με τους σχετικούς όγκους υγρού και υπερκείμενης αέριας φάσης. Συνεπώς, είναι πολύ σημαντικό να διατηρηθούν σταθεροί οι όγκοι δειγμάτων και υπερκείμενης αέριας φάσης σε όλα τα δείγματα^[21].

Μία πεπερασμένη χρονική περίοδος απαιτείται για να φθάσει στην **ισορροπία** η κατανομή της διαλυμένης ουσίας μεταξύ της υγρής φάσης ενός δείγματος, της υπερκείμενης αέριας φάσης και του προσροφητικού υλικού της ίνας. Οι διαφορές που εμφανίζουν οι ενώσεις-στόχοι στους **χρόνους** που απαιτούν για την επίτευξη της **ισορροπίας** οφείλεται στις μεγάλες διαφορές των τιμών των **συντελεστών διάχυσης** και **σταθερών κατανομής** που τις χαρακτηρίζουν. Οι διαφορές ενώσεις-στόχοι

χαρακτηρίζονται από μία σταθερά κατανομής και ένα συντελεστή διάχυσης οι οποίοι περιγράφουν την πορεία της ένωσης-στόχου μεταξύ μήτρας και εκχυλιστικής φάσης κατά την διαδικασία της εκχύλισης. Οι *συντελεστές διάχυσης* που χαρακτηρίζουν τις ενώσεις *δεν φέρουν μεγάλες αποκλίσεις* μεταξύ τους *σε αντίθεση με τις σταθερές κατανομής*, γεγονός που απλουστεύει την βαθμονόμηση της μεθόδου (calibration). Επομένως, μελετώντας τα χρωματογραφήματα οι μεγάλες κορυφές (large peak area) αντιστοιχούν σε αναλύτες με μεγάλες σταθερές κατανομής ενώ οι μικρές κορυφές (small peak area) αντιστοιχούν σε αναλύτες με μικρές σταθερές κατανομής. Όσο αφορά τους συντελεστές διάχυσης οι ενώσεις με παρόμοια μοριακά βάρη εμφανίζουν στα χρωματογραφήματα παρόμοιου μεγέθους κορυφές^[7,21].

5.2 Ενώσεις-στόχοι κατά την εφαρμογή HSSPME

Οι **πηκτικές ενώσεις** εμφανίζουν μικρή σταθερά κατανομής μεταξύ υπερκείμενης αέριας φάσης και του πολυμερικού στρώματος της ίνας (k_{fn}) και μεγάλη σταθερά κατανομής μεταξύ του υγρού δείγματος και της υπερκείμενης αέριας φάσης (k_{hs}) ενώ ταυτόχρονα χαρακτηρίζονται από μεγάλη σταθερά Henry (K'_H) με αποτέλεσμα να προτιμούν την αέρια φάση. Οι πηκτικές ενώσεις διαχέονται πολύ εύκολα και γρήγορα από την υδατική φάση στην αέρια φάση των τριών-φάσεων συστήματος αλλά δύσκολα κατανέμονται στο εσωτερικό του πολυμερούς που επικαλύπτει την ίνα λόγω μικρού συντελεστή διάχυσης^[6].

Με μεγάλη σταθερά κατανομής μεταξύ υπερκείμενης αέριας φάσης και του πολυμερικού στρώματος της ίνας (k_{fn}), και με μικρή σταθερά Henry (K'_H) χαρακτηρίζονται οι **ημιπηκτικές ενώσεις** με αποτέλεσμα να προτιμούν την υδατική φάση. Οι ημιπηκτικές ενώσεις εμφανίζουν δυσκολία στην μεταφορά τους από την μήτρα στον αέριο χώρο που βρίσκεται από πάνω της λόγω μικρής σταθεράς

κατανομής μεταξύ του υγρού δείγματος και της υπερκείμενης αέριας φάσης (k_{hs}). Οι ημιπτητικές ενώσεις με μεγαλύτερη ευκολία κατανέμονται στο εσωτερικό του πολυμερούς που επικαλύπτει την ίνα λόγω του σχετικά μεγάλου συντελεστή διάχυσης. Συμπερασματικά, η ανάλυση των ημιπτητικών ενώσεων θα έχει μεγαλύτερη ακρίβεια αλλά θα απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο ανάλυσης^[6].

Η τεχνική μικροεκχύλισης στερεής φάσης κατά την οποία η ίνα που φέρει το πολυμερικό υλικό τοποθετείται στην υπερκείμενη αέρια φάση (headspace) είναι αποτελεσματικότερη για πτητικές ενώσεις καθώς διαθέτουν μεγάλες σταθερές Henry (K'_H). Όσο μειώνεται η πτητικότητα των ενώσεων τόσο οι σταθερές Henry αποκτούν μικρότερες τιμές με αποτέλεσμα τη παράταση του χρόνου που απαιτείται για να επέλθει ισορροπία μεταξύ του δείγματος, της υπερκείμενης φάσης και του πολυμερικού στρώματος της ίνας. Οι ενώσεις που χαρακτηρίζονται από υψηλούς συντελεστές οκτανόλης/νερού (k_{ow}) και από χαμηλές σταθερές Henry (K'_H) οδηγούν σε υψηλή ευαισθησία της μεθόδου SPME αλλά και σε εκτεταμένη χρονική περίοδο επίτευξης της θερμοδυναμικής ισορροπίας μεταξύ των φάσεων ενώ συχνά δεν επέρχεται εν τέλει η ισορροπία μέσα σε λογικά χρονικά δεδομένα^[6,7,16,17].

Η χημική ένωση **φαινανθρένιο (phenanthrene)** και η χημική ένωση **ακεναφθένιο (acenaphthene)** έχουν παρόμοιοι συντελεστές οκτανόλης/νερού (k_{ow}) και σταθερές Henry (K'_H). Παρόλα αυτά η πρώτη ένωση είναι ημιπτητική και απαιτεί μεγάλο χρόνο για να φτάσει σε συνθήκες ισορροπίας και η δεύτερη είναι πτητική ένωση η οποία διαχέεται γρήγορα και εύκολα προς την υπερκείμενη αέρια φάση. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται όταν οι ενώσεις-στόχοι κυμαίνονται γενικά σε χαμηλές K'_H και έτσι μία ένωση με ελάχιστα μικρότερη τιμή K'_H από μία άλλη εμφανίζει πολύ μεγαλύτερους χρόνους ισορροπίας. Το **φλουορανθένιο**

(fluoranthene) και το πυρένιο (pyrene) διαθέτουν υψηλούς συντελεστές οκτανόλης/νερού (k_{ow}) και χαμηλές σταθερές Henry (K_H'). Οι χημικές αυτές ενώσεις είναι ημιπτητικές και παρόλο που δε φτάνουν σε συνθήκες ισορροπίας ακόμη και μετά από 60 λεπτά, το ποσοστό που εκχυλίζεται από την ίνα πολυμερούς είναι ικανοποιητικό^[21].

5.3 Σύστημα τριών φάσεων

Η μικροεκχύλιση από τον υπερκείμενο χώρο με ίνα πολυμερούς βασίζεται στην ισορροπία μεταξύ τριών φάσεων: της υδατικής φάσης, του υπερκείμενου χώρου και της φάσης εκχύλισης. Επομένως, υπάρχουν δύο διεπιφάνειες, η διεπιφάνεια μήτρας-υπερκείμενης φάσης και η διεπιφάνεια υπερκείμενης φάσης-φάσης εκχύλισης^[17]. Η μεταφορά μάζας στον υπερκείμενο χώρο θεωρείται μια γρήγορη σχετικά διαδικασία, γιατί οι συντελεστές διάχυσης στην αέρια φάση είναι περίπου 10^4 - 10^5 φορές μεγαλύτεροι από τους συντελεστές διάχυσης στην υγρή φάση. Αυτό συμβαίνει λόγω σχηματισμού της ζώνης μείωσης «depletion zone» γύρω από την ίνα στην περίπτωση όπου η ίνα πολυμερούς εμβαπτίζεται στο υγρό δείγμα. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ύπαρξη στρώματος προστασίας από μόρια νερού (fluid shielding) και στον αργό ρυθμό διάχυσης των αναλυτών μέσα στην υγρή μήτρα. Παρόλα αυτά τα **περιοριστικά στάδια** στην διαδικασία της μεθόδου μικρο-εκχύλισης υπερκείμενου χώρου παραμένουν τόσο ο αργός ρυθμός μεταφοράς της μάζας από την μήτρα στη φάση ατμών όσο και ο ρυθμός διάχυσης των αναλυτών στο στρώμα πολυμερούς της ίνας^[6,20,21].

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας υποστηρίζουν την ύπαρξη δύο καθοριστικών σταδίων στην διαδικασία της εκχύλισης^[21]: η μεταφορά μάζας από την υδατική φάση στην αέρια φάση^[6], η διάχυση των ουσιών στη στατική πολυμερική

φάση που χρησιμοποιείται στην εκχύλιση. Παρόλο που η διάχυση του αναλύτη στο στρώμα πολυμερούς της ίνας δεν βελτιώνεται εύκολα στην πράξη, η μεταφορά της μάζας από την υδατική φάση μπορεί εύκολα να ενισχυθεί.

Συνεπώς, ο εκτεταμένος χρόνος που απαιτείται για να επέλθει θερμοδυναμική ισορροπία μεταξύ των φάσεων αλλά και η μείωση της εκχυλιζόμενης ποσότητας όταν οι ενώσεις-στόχοι είναι ημιπτητικές, αποτελούν προβλήματα στην εφαρμογή της μεθόδου τα οποία όμως υπερνικούνται όταν άρεται ο περιορισμός της μεταφοράς μάζας από την υγρή στην αέρια φάση. Γι' αυτό λοιπόν το σκοπό χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές, οι πιο κλασικές περιλαμβάνουν τη χρήση ανάδευσης κατά την εκχύλιση, την αύξηση θερμοκρασίας του δείγματος και τη προσθήκη άλατος στην υγρή μήτρα. Στις **νέες προσεγγίσεις** που φαίνεται να καταπολεμούν αποτελεσματικά τους περιορισμούς της μικροεκχύλισης στερεής φάσης από την υπερκείμενη φάση περιλαμβάνονται **η μείωση του όγκου της υπερκείμενης αέριας φάσης, η αύξηση του όγκου της φάσης εκχύλισης, η αύξηση του όγκου του δείγματος και ο συνδυασμός μερικών από αυτών των τεχνικών, μοντέρνων και κλασικών**^[6,20,21].

Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζεται η **εφαρμογή συνθηκών κενού** στην υπερκείμενη αέρια φάση της δειγματοληπτικής φιάλης **σε συνδυασμό με ανάδευση** ως μία νέα τροποποίηση της μικροεκχύλισης που φαίνεται να επιδρά θετικά στη μέθοδο. Με την εφαρμογή συνθηκών χαμηλής πίεσης στη δειγματοληπτική φιάλη αποδεικνύεται η ύπαρξη τριών φάσεων στο σύστημα καθώς και ο περιορισμός μεταφοράς μάζας από την υγρή στην αέρια φάση. Στην πραγματικότητα, η εφαρμογή συνθηκών κενού κατά την εκχύλιση ημιπτητικών ενώσεων ενισχύει την μεταφορά μάζας από την υδατική φάση προς τον υπερκείμενο χώρο και μειώνει τον χρόνο αποκατάστασης της θερμοδυναμικής ισορροπίας με αποτέλεσμα να επιταχύνει την διαδικασία της εκχύλισης^[20,21].

Αξίζει να σημειωθεί ότι στη περίπτωση όπου οι ενώσεις προς ανάλυση είναι πτητικές δεν παρατηρείται σημαντική αλλαγή στο χρόνο αποκατάστασης της ισορροπίας του συστήματος ή στην ποσότητα που εκχυλίζεται από το προσροφητικό υλικό συναρτήσει του χρόνου με την εφαρμογή των αναφερόμενων τεχνικών κατά την διαδικασία της HSSPME. Αυτό αποδεικνύεται και στην παρούσα μελέτη όπου δεν παρατηρείται κάποια επίδραση από την εφαρμογή συνθηκών κενού κατά την διάρκεια της μικροεκχύλισης πτητικών ενώσεων-στόχων. Παρατηρείται ότι οι καμπύλες της ποσότητας των πτητικών ενώσεων-στόχων που εκχυλίζονται σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα προς αυτό το χρονικό διάστημα υπό συνθήκες κενού συμπίπτουν με εκείνες που λήφθηκαν υπό ατμοσφαιρική πίεση, σε αντίθεση με τους ημιπτητικούς αναλυτές όπου η εφαρμογή συνθηκών κενού στη δειγματοληπτική φιάλη είναι καθοριστική για την αποτελεσματικότητα της μεθόδου μικροεκχύλισης^[17,20,21].

6^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΘΕΩΡΙΑ SPME

6.1 Θερμοδυναμική θεωρία SPME

Η μέθοδος της SPME είναι μία τεχνική εκχύλισης που βασίζεται στην **ισορροπία μεταξύ των φάσεων**, στις οποίες κατανέμεται ο αναλύτης, δεν προκαλεί εξαντλητική εκχύλιση του αναλύτη από το δείγμα. Η διεργασία αυτού του είδους εκχύλισης ολοκληρώνεται τυπικά όταν έχει επέλθει ισορροπία κατανομής των ουσιών μεταξύ της μήτρας του δείγματος, της υπερκείμενης φάσης αν υπάρχει και του υλικού επικάλυψης της ίνας. Με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης η εκχυλιζόμενη ποσότητα δεν αυξάνεται. Παρόλα αυτά είναι εφικτή η ανάλυση ουσίας που δεν έχει έρθει σε κατάσταση ισορροπίας. Το μόνο που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη είναι ο χρόνος εκχύλισης και η θερμοκρασία να παραμένουν σταθερά για να λαμβάνονται επαναλήψιμα αποτελέσματα^[21].

Η θεωρία που βρίσκεται πίσω από την μέθοδο μικροεκχύλισης στερεής φάσης έχει ερευνηθεί διεξοδικά από τον Ai και την ερευνητική του ομάδα. Σύμφωνα λοιπόν με τον Ai η αρχική συγκέντρωση των αναλυτών στο δείγμα, και όχι η θέση της ίνας, είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των αναλυτών που εκχυλίζονται από την φάση εκχύλισης, εφόσον οι όγκοι του δείγματος, εκχυλιζόμενης φάσης και υλικού επικάλυψης είναι σταθερά. Τα εκχυλιζόμενα δείγματα είναι πολύπλοκα συστήματα και για την κατανόηση των μηχανισμών της διεργασίας θεωρείται η μήτρα ομοιογενής (πχ καθαρό νερό). Συνεπώς εφόσον αποκατασταθεί η θερμοδυναμική ισορροπία στο σύστημα τριών ή δύο φάσεων η συγκέντρωση του αναλύτη θα είναι σταθερή και ίση με το άθροισμα των συγκεντρώσεων του στη κάθε φάση που έχει

κατανομηθεί δηλαδή στην μήτρα, στην υπερκείμενη φάση (αν υπάρχει) και στη φάση εκχύλισης^[16,17].

Σχέση: αρχικής συγκέντρωσης αναλύτη στο δείγμα – συγκέντρωση αναλύτη που εκχυλίζεται σε συνθήκες ισορροπίας

$$(1) C_o * V_s = C_f^\infty * V_f + C_h^\infty * V_h + C_s^\infty * V_s$$

C_o :αρχική συγκέντρωση αναλύτη στο δείγμα

$C_f^\infty, C_h^\infty, C_s^\infty$:οι συγκεντρώσεις του αναλύτη στην πολυμερική επικάλυψη της ίνας, στην υπερκείμενη φάση, στο δείγμα όταν έχει φτάσει σε ισορροπία

$V_f^\infty, V_h^\infty, V_s^\infty$:οι όγκοι της πολυμερικής επικάλυψης της ίνας, της υπερκείμενης φάσης, του δείγματος.

Οι παράμετροι ισορροπίας της SPME φαίνονται στην εξίσωση που εκφράζει την μάζα του αναλύτη στο υλικό επικάλυψης της ίνας ($n = C_f^\infty * V_f$)όπως αναφέρει ο Pawliszyn:

$$(2) n = \frac{K_{fs} V_f V_s C_o}{K_{fs} V_f + V_s}$$

(κατανομή μεταξύ φάση μήτρας και φάση ίνας, χωρίς υπερκείμενη φάση)

(3) $K_{fs} = K_{fh} K_{hs}$: σταθερά κατανομής μεταξύ πολυμερικής επικάλυψης της ίνα-φάση μήτρα

(4) $K_{fh} = \frac{C_f^\infty}{C_h^\infty}$:σταθερά κατανομής πολυμερικής επικάλυψης της ίνας μεταξύ

υπερκείμενης φάσης

(5) $K_{hs} = \frac{C_h^\infty}{C_s^\infty}$: σταθερά κατανομής υπερκείμενη φάσης προς φάση μήτρας

$$(2),(3),(4), (5) \rightarrow n = \frac{K_{fh}k_{hs}V_f C_o V_s}{K_{fh}k_{hs}V_f + K_{hs}V_h + V_s} \quad (6)$$

(κατανομή μεταξύ φάσης μήτρας, υπερκείμενης φάσης και φάσης ίνας)

Αν ο όγκος του δείγματος είναι πολύ μεγάλος $K_{fs}V_f \ll V_s$ τότε η (2) εξίσωση γίνεται: $n = K_{fs}V_f C_o$ (7). Η ποσότητα της εκχυλιζόμενης ουσίας είναι ανεξάρτητη από τον όγκο του δείγματος σύμφωνα με την προηγούμενη πρόταση και δεν χρειάζεται να καθοριστεί πριν την ανάλυση. Η εκχυλιζόμενη ποσότητα θα αντιστοιχεί κάθε φορά στη συγκέντρωση της ουσίας και θα είναι ανεξάρτητη του όγκου του δείγματος^[16,17].

6.2 Θεωρία HSSPME-Επίδραση πίεσης

Σύμφωνα με την ως τώρα θερμοδυναμική θεωρία οι συγκεντρώσεις των ενώσεων όταν το κλειστό σύστημα είναι σε ισορροπία είναι ανεξάρτητες από την ολική πίεση που επικρατεί μέσα σε αυτό καθώς ο συντελεστής κατανομής/η σταθερά Henry επηρεάζονται μόνο από πολύ υψηλές πιέσεις μέσα στο σύστημα ($P > 500$ kPa)^[30]. Στη παρούσα μελέτη, ανατρέπεται το γεγονός κατά το οποίο η αποτελεσματικότητα της HSSPME δεν εξαρτάται από την πίεση που επικρατεί κατά την διαδικασία. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν κατά την VAC-HSSPME δείχνουν ανάλογα με την φύση των αναλυτών, την **εξάρτηση της πίεσης κατά την δειγματοληψία** με την ταχύτητα της εκχύλισης και συνεπώς με την συνολική αποτελεσματικότητα της μεθόδου.

Το πολύπλοκο σύστημα που εκπροσωπεί τη διαδικασία της HSSPME θεωρείται ως ένα τριών- φάσεων κλειστό σύστημα συγκεκριμένου όγκου. Το φαινόμενο που καθορίζει και χαρακτηρίζει την HSSPME μέθοδο είναι η μεταφορά

μάζας μεταξύ των τριών φάσεων (δείγμα, υπερκείμενη φάση, ίνα) διαμέσου των δύο διεπιφανειών (δείγμα/υπερκείμενη φάση, υπερκείμενη φάση/ίνα) οι οποίες αποτελούν το φράγμα που παρεμποδίζει την μεταφορά των αναλυτών. Εφόσον η κατανομή των αναλυτών φτάσει σε ισορροπία μεταξύ δείγματος και υπερκείμενης φάσης εισάγεται η ίνα και απευθείας αρχίζει η ρόφηση των αναλυτών δηλαδή η μεταφορά από την υπερκείμενη φάση στην ίνα. Αυτό συντελεί στη μείωση της συγκέντρωσης των αναλυτών στην υπερκείμενη φάση η οποία αποκαθίσταται καθώς ενεργοποιείται η μεταφορά μάζας από το δείγμα στην υπερκείμενη φάση^[6,7].

Η HSSPME διαθέτει δύο καθοριστικά στάδια *τη μεταφορά μάζας από την υδατική φάση στην αέρια φάση και η διάχυση των ουσιών στη στατική πολυμερική φάση που χρησιμοποιείται στην εκχύλιση*. Η μεταφορά μάζας στον υπερκείμενο χώρο θεωρείται μια γρήγορη σχετικά διαδικασία, γιατί οι συντελεστές διάχυσης στην αέρια φάση είναι περίπου 10^4 - 10^5 φορές μεγαλύτεροι από τους συντελεστές διάχυσης στην υγρή φάση. Στη περίπτωση ημιπτητικών αναλυτών, η μεταφορά τους από το δείγμα στην υπερκείμενη φάση δηλαδή η ταχύτητα εξάτμισής τους αποτελεί το αργό στάδιο δηλαδή είναι το βήμα που καθορίζει την ταχύτητα της όλης διαδικασίας. Το στάδιο της διάχυσης του αναλύτη στο στρώμα πολυμερούς της ίνας θεωρείται το γρήγορο στάδιο^[6,7].

Η φυσική **διαδικασία της εξάτμισης οργανικών ενώσεων** από υδάτινο περιβάλλον θεωρείται αντίδραση πρώτης τάξεως.

$$C_s = C_s^o e^{-kt} \quad (8)$$

C_s : η μεταβολή της συγκέντρωσης του αναλύτη στην υδατινή φάση σε σχέση με το χρόνο (t).

k: η σταθερά ταχύτητας της εξάτμισης

Ολοκληρώνοντας την εξίσωση (8) ως προς το χρόνο, η προκύπτουσα εξίσωση (9) αντιπροσωπεύει τη μεταβολή της συγκέντρωσης του αναλύτη στη διεπιφάνεια δείγμα-υπερκείμενη φάση.

$$V_s \frac{dC_s}{dt} = -K_L A (C_s - C_i) \quad (9)$$

V_s : ο όγκος του δείγματος

C_i : η συγκέντρωση του αναλύτη στην διεπιφάνεια νερού-αέρα

A : η διεπιφάνεια (το σύνορο) μεταξύ υδάτινης φάσης και αέριας φάσης

K_L : ο συντελεστής της συνολικής μεταφοράς μάζας μεταξύ της αέριας και υδάτινης φάσης μέσα στη ζώνη της διεπιφάνειας

Η ολοκλήρωση της (9) εξίσωσης καταλήγει σε μία νέα εξίσωση στην οποία συσχετίζεται η σταθερά ταχύτητας της εξάτμισης (k) με τον συντελεστή της συνολικής μεταφοράς μάζας μεταξύ της αέριας και υδάτινης φάσης μέσα στη περιοχή της διεπιφάνειας (K_L).

$$k = \frac{K_L}{L} \quad (10)$$

L : το βάθος του διαλύματος μέσα σε δοχείο με ομοιόμορφη διατομή

Ο Liss και ο Stater^[31] και αργότερα ο Mackay με τον Leinonen^[32] ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν **τον συντελεστή της συνολικής μεταφοράς μάζας μεταξύ της αέριας και της υδάτινης φάσης μέσα στη ζώνη της διεπιφάνειας (K_L)**. Ο αναφερόμενος συντελεστής περιγράφεται από την εξίσωση (11), η οποία βασίζεται στην θεωρία των δύο φάσεων (two-film theory), στο μοντέλο πλήρους ανάδευσης του συστήματος (flux-matching boundary condition) και στην υπόθεση ότι **η συνολική αντίσταση στην μεταφορά μάζας προέρχεται είτε από το λεπτό στρώμα της**

αέριας φάσης είτε της υγρής ή και από τα δύο στρώματα που είναι παρακείμενα στην ζώνη της διεπιφάνειας δείγματος/υπερκείμενης φάσης.

$$K_L = \left[\frac{1}{k_L} + \frac{1}{K_H k_g} \right]^{-1} \quad (11)$$

k_L : συντελεστής μεταφοράς μάζας στην υδάτινη φάση

K_H : η σταθερά του νόμου του Henry

k_g : συντελεστής μεταφοράς μάζας στην αέρια φάση

Γενικά, θεωρείτε ότι οι πηκτικές ενώσεις μεταφέρονται γρήγορα και εύκολα στην αέρια φάση γιατί χαρακτηρίζονται από υψηλή τάση ατμών, υψηλές K_H και σχετικά μικρά μοριακά βάρη. Παρόλα αυτά στην αέρια φάση μπορούν να μεταφερθούν και ημιπηκτικές ενώσεις η οποίες χαρακτηρίζονται από χαμηλή τάση ατμών, χαμηλές K_H και σχετικά μεγάλα μοριακά βάρη. Αυτό το φαινόμενο συμβαίνει όταν οι ημιπηκτικές ενώσεις είναι υδρόφοβες δηλαδή διαθέτουν υψηλό συντελεστή κατανομής οκτανόλης/νερού (K_{ow}) και έχουν χαμηλές διαλυτότητες στο νερό. Επομένως, η αναλογία της συγκέντρωσης του ημιπηκτικού αναλύτη στην ατμόσφαιρα προς την συγκέντρωση του στο νερό (C_g/C_w) είναι μεγάλη παρόλη την χαμηλή τάση ατμών που χαρακτηρίζει τον αναλύτη. Αυτή η αναλογία αναφέρεται και ως «αδιάστατη» σταθερά Henry (K'_H) η οποία στην ουσία δείχνει ποια φάση θα είναι το φράγμα στην μεταφορά της μάζας^[21,22,6,7].

Η **μεταφορά των χημικών ενώσεων** από το νερό στην ατμόσφαιρα καθορίζεται από το **ρυθμό εξάτμισής** τους ο οποίος εξαρτάται από: την αντίσταση της μεταφοράς μάζας^[21,22]:

- μέσα στην υδάτινη φάση
- μέσα στην αέρια φάση

- συνδυασμός των ανωτέρων

Η φάση στην οποία αποδίδεται η παρεμπόδιση της μεταφοράς μάζας **εξαρτάται από την τιμή του K'_H** που χαρακτηρίζει τον εκάστοτε **αναλύτη**^[21,22,32].

- Ένωση με υψηλό K'_H ($>5 \cdot 10^{-3} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$) \rightarrow η αντίσταση στη μεταφορά μάζας προέρχεται κυρίως από την υδάτινη φάση.
- Ένωση με χαμηλό K'_H ($\leq 1.2 \cdot 10^{-5}$ ή $1.6 \cdot 10^{-4} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$)^[32,37,46]
 \rightarrow η αντίσταση στη μεταφορά μάζας προέρχεται κυρίως από την αέρια φάση ($K_L \approx K'_H k_g$).
- Ένωση με ενδιάμεση τιμή K'_H \rightarrow η αντίσταση στη μεταφορά μάζας προέρχεται από τον συνδυασμό της αντίστασης της αέριας και της υγρής φάσης.

Ο **μοριακός συντελεστής διάχυσης στην αέρια φάση (D_g)** του αναλύτη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω πολλών και διαφορετικών υπολογιστικών μεθόδων οι οποίες δείχνουν ότι είναι ανεξάρτητος της πολικότητας των αναλυτών και αντιστρόφως ανάλογος της ολικής πίεσης (P). Η μέθοδος υπολογισμού του D_g των Fuller–Schettler–Giddings είναι η πιο ακριβής^[33,34].

$$D_g = \frac{0.001 \times T^{1.75} \sqrt{\frac{1}{M_{air}} + \frac{1}{M_C}}}{P \left[(\sum V_{air})^{1/3} + (\sum V_C)^{1/3} \right]^2} \quad (12)$$

T: η απόλυτη θερμοκρασία

M_{air}, M_C : είναι τα μοριακά βάρη για τον αέρα και για τον οργανικό αναλύτη αντίστοιχα

P: η ολική πίεση

V_{air}, V_C : είναι οι γραμμομοριακοί όγκοι του αέρα και του αναλύτη αντίστοιχα

Ο συντελεστής μεταφοράς μάζας στην αέρια φάση (k_g) είναι ανάλογος με τον μοριακό συντελεστή διάχυσης στην αέρια φάση (D_g) υψωμένο σε μία δύναμη m :
 $k_g \propto D_g^m$ [34].

Η αφαίρεση του μεγαλύτερου ποσοστού του αέρα από την δειγματοληπτική φιάλη πριν την εισαγωγή του δείγματος οδηγεί σε **μείωση της ολικής πίεσης** στο κλειστό αυτό σύστημα.

Εάν στο κλειστό σύστημα επικρατούν συνθήκες κενού, η θερμοκρασία είναι σταθερή και η επίδραση της εναπομείνουσα ποσότητας αέρα είναι πολύ μικρή στην διαμόρφωση του D_g , για **αναλύτες με χαμηλά K'_H** η μείωση της ολικής πίεσης του συστήματος οδηγεί σε αύξηση του D_g . Σύμφωνα με την εξίσωση $k_g \propto D_g^m$ η αύξηση του μοριακού συντελεστή διάχυσης στην αέρια φάση D_g συντελεί σε αύξηση του συντελεστή μεταφοράς μάζας στην αέρια φάση k_g και εν συνεχεία αύξηση στο συνολικό συντελεστή μεταφοράς μάζας K_L σύμφωνα με την εξίσωση $K_L \approx K'_H k_g$.

Στη περίπτωση, λοιπόν, **ημιπτητικών αναλυτών** η διαδικασία της εξάτμισης από την υδάτινη μήτρα στην υπερκείμενη αέρια φάση εξαρτάται από το συντελεστή μεταφοράς μάζας στην αέρια φάση (k_g) και ο ρυθμός της εξάτμισης αυξάνεται με τη μείωση της πίεσης στην υπερκείμενη φάση.

Η δειγματοληψία με τη μέθοδο **HSSPME πριν φτάσει σε ισορροπία** το σύστημα οδηγεί σε ταχύτερη εξάτμιση των αναλυτών καθώς η μείωση της συγκέντρωσής τους στην υπερκείμενη αέρια φάση κατά την δειγματοληψία (λόγω της ρόφησης τους πάνω στην ίνα) αναπληρώνεται αμέσως.

Αυτό αποδεικνύει ότι **το καθοριστικό στάδιο για όλη την διεργασία της HSSPME είναι η μεταφορά της μάζας από το υδάτινο δείγμα στην υπερκείμενη αέρια φάση** και γι αυτό στη HSSPME μέθοδο η ισορροπία επέρχεται ταχύτερα υπό συνθήκες κενού σε σύγκριση με αυτή υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης.

7^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

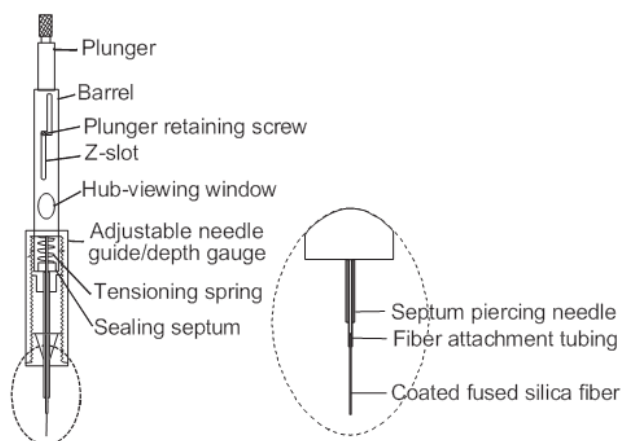
ΕΚΧΥΛΙΣΤΙΚΗ ΦΑΣΗ-SPME FIBER

7.1 Συσκευή μικρο-εκχύλισης στερεής φάσης (SPME fiber holders)

Ο απαραίτητος εξοπλισμός για την πραγματοποίηση της τεχνικής SPME είναι πολύ απλός. Αποτελείται από μια κατάλληλη συσκευή δειγματοληψίας η οποία φέρει χαρακτηριστικά σύριγγας. Αυτή η συσκευή αποτελείται από δυο τμήματα, το τμήμα συγκράτησης της ίνας και το τμήμα συναρμολόγησης αυτής. Το τμήμα συγκράτησης περιλαμβάνει ένα οδηγό ρυθμιζόμενου μεγέθους (adjustable depth gauge) ο οποίος αποτελείται από: ένα ρυθμιζόμενο ελατήριο, ένα κυλινδρικό εξάρτημα από ανοξείδωτο ατσάλι και ένα μεταβαλλόμενης απόστασης εξάρτημα πάνω στο οποίο βιδώνεται η ίνα. Ο οδηγός διατηρεί σταθερό κάθε φορά το βάθος στο οποίο θα εισέλθει η βελόνα στη φιάλη ή στο σύστημα εισαγωγής. Η σταθερή θέση της ίνας είναι βασική παράμετρος για την εξαγωγή επαναλήψιμων αποτελεσμάτων ενώ ταυτόχρονα προστατεύει την ίνα από τυχόν σπάσιμο. Μία μικρή βίδα (plunger) περιορίζει την κίνηση της ίνας σε μία σχισμή της συσκευής η οποία έχει σχήμα Z^[7,38].

Στο τμήμα συναρμολόγησης τοποθετούνται οι διάφορες ίνες μήκους 1 – 2 cm που χρησιμοποιούνται κατά την ανάλυση. Το συγκεκριμένο είδος συσκευής επιτρέπει την επαναλαμβανόμενη χρησιμοποίησή της σε διαφορετικά δείγματα, ενώ παράλληλα είναι πολύ εύκολη η αποσυναρμολόγηση της για την τοποθέτηση ίδιου ή διαφορετικού τύπου ίνας. Για την πραγματοποίηση της εκρόφησης η ίνα εκτίθεται στο δείγμα με την πίεση του εμβόλου. Υπάρχουν τρία είδη συσκευών συγκράτησης τα οποία χρησιμοποιούνται για τις ίνες SPME. Η συσκευή η οποία χρησιμοποιείται στην περίπτωση της σύζευξης της SPME με υγρή χρωματογραφία (automatic holder), η συσκευή η οποία χρησιμοποιείται στην περίπτωση της σύζευξης της SPME με

αέρια χρωματογραφία (manual holder) και ειδική συσκευή για δειγματοληψία στο πεδίο^[7,38].



Εικ. 7.1. Εμπορική συσκευή μικρο-εκχύλισης στερεής φάσης από την Supelco.

7.2 Ίνα επικαλυμμένη με πολυμερές υλικό

Η αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεής φάσης εξαρτάται από την **σταθερά κατανομής** των αναλυτών από τη μήτρα ή τον υπερκείμενο χώρο προς τις στρώσεις πολυμερικού υλικού της ίνας k_{fs} ή k_{fh} . Αυτή η σταθερά περιγράφει τις **φυσικοχημικές ιδιότητες του πολυμερικού υλικού της επίστρωσης** και την **εκλεκτικότητά** του προς τις ενώσεις-στόχους σε σχέση με τα λοιπά συστατικά που υπάρχουν στην μήτρα. Γενικά τα πολυμερικά υλικά που επικαλύπτουν την ίνα εμφανίζουν ισχυρή συγγένεια με τις οργανικές ενώσεις-στόχους καθώς οι ενώσεις αυτές χαρακτηρίζονται από υψηλές σταθερές κατανομής k_{fs} . Η σταθερά κατανομής αυξάνεται ανάλογα με το μοριακό βάρος και το σημείο ζέσεως των αναλυτών. Παρόλα αυτά η σταθερά κατανομής δεν είναι τόσο μεγάλη ώστε να επιτυγχάνεται πλήρης εκχύλιση των αναλυτών από το δείγμα γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η SPME είναι μία αναλυτική μέθοδος που στηρίζεται στις αρχές της ισορροπίας. Επίσης, το πάχος της στρώσης πολυμερούς πάνω στην ίνα επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της ρόφησης και το χρόνο εκχύλισης. Συγκεκριμένα τα λεπτά

στρώματα είναι αποτελεσματικά στην ρόφηση ημιπηκτικών ενώσεων ενώ τα παχιά στρώματα είναι κατάλληλα για πτητικές ενώσεις. Ακόμη ο συντελεστής διάχυσης που χαρακτηρίζει τους αναλύτες επηρεάζει το χρόνο εκχύλισης και το κατά πόσο ένας αναλύτης θα διεισδύσει στο εσωτερικό της ίνας. Σε γενικές γραμμές προτιμούνται τα λεπτά στρώματα πολυμερικής επικάλυψης καθώς όσο αυξάνεται το πάχος της επίστρωσης τόσο αυξάνεται και ο χρόνος εκχύλισης^[7].

Ο όγκος και η επιφάνεια της επικάλυψης από πολυμερικό υλικό επιδρούν στην συγκέντρωση των αναλυτών που εκχυλίζονται, το είδος του πολυμερικού υλικού καθορίζει την επιλεκτικότητα της μεθόδου, το πάχος του στρώματος του πολυμερούς και ο συντελεστής διάχυσης επηρεάζουν δραστικά το χρόνο εκχύλισης και η σταθερά κατανομής επηρεάζει την ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου. **Γι' αυτό το λόγο η σωστή επιλογή της επικαλυμμένης από πολυμερές ίνας καθορίζει την αποτελεσματικότητα και την ακρίβεια της μεθόδου της μικρο-εκχύλισης στερεής φάσης.** Το κατάλληλο πολυμερικό υλικό που επικαλύπτει την ίνα τηγμένου υμενίου του πυριτίου είτε επιλέγεται από τα εμπορικά διαθέσιμα (commercial fibre) είτε σχεδιάζεται εκ νέου (custom-made fibre) σύμφωνα με τις ανάγκες που πρέπει να εξυπηρετήσει (ανάλογα με τη φύση των αναλυτών και τη φύση της στήλης στην υγρή ή αέρια χρωματογραφία)^[9,17,20,38].

7.2.1 Υγρές-Στερεές επικαλύψεις ίνας

Η τριχοειδής ίνα συνήθως είναι κατασκευασμένη από τηγμένο διοξείδιο του πυριτίου (fused silica) και καλύπτεται είτε από υμένιο υγρού πολυμερικού υλικού παρόμοιας φύσης με αυτά που χρησιμοποιούνται ως πολυμερική φάση στις αεριοχρωματογραφικές στήλες είτε από στερεό υλικό με υψηλό πορώδες το οποίο φέρει το υγρό πολυμερικό υλικό. Τα πολυμερικά υλικά που φέρουν οι ίνες

ταξινομούνται στα **α)** καθαρά, υγρά πολυμερή όπως το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο PDMS ή οι πολυακρυλικοί εστέρες (PA) και **β)** στρεά πολυμερή, αναφέρονται στα υγρά πολυμερή (PDMS, Carbowax) που έχουν εμποτιστεί σε στερεά πορώδη υλικά (μικτές επιστρώσεις), όπως Carboxen, Divinylbenzene (DVB) ή μίγμα DVB – Carboxen. Τα μίγματα αυτά συνδυάζουν την ικανότητα ρόφησης των υγρών πολυμερών και των πορωδών στερεών σωματιδίων. Η εκχύλιση των αναλυτών από την ίνα πολυμερούς μπορεί είτε να γίνει μέσω μηχανισμού απορρόφησης είτε μέσω μηχανισμού προσρόφησης. Τα εμπορικά διαθέσιμα πολυμερικά υλικά (Πίνακας 7.1) που επικαλύπτουν την ίνα τηγμένου υμενίου του πυριτίου είναι πολλά και με ποικιλία σε πάχος^[7,17,20,38].

Πίνακας 7.1. Εμπορικά διαθέσιμα πολυμερικά υλικά.

Coating	Thickness μm	Προτεινόμενη χρήση	Μέγιστη T(°C)στον εισαγωγέα του GC	Εφαρμογές
Poly(dimethylsiloxane) PDMS	100	GC,HPLC	280	Μη πολικές οργανικές ενώσεις
Poly(dimethylsiloxane) PDMS	30	GC,HPLC	280	(VOCs,PAH,βενζόλιο, τουλουόλιο, αιθυλοβενζόλιο,
Poly(dimethylsiloxane) PDMS	7	GC,HPLC	340	ξυλένιο, οργανοχλωριομένα φυτοφάρμακα)
Polyacrylate (PA)	85	GC,HPLC	320	Πολικές οργανικές ενώσεις (τριαζίνες, οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα,φαινόλες)
Mixed phases				
PDMS-divinylbenzene	65	GC	270	Αρωματικοί

(DVB)				υδρογονάνθρακες, αρωματικές αμίνες, VOCs
	60	GC	270	
Carboxen – PDMS	75	GC	320	VOCs, υδρογονάνθρακες
CW– templated resin (TR)	50	HPLC		Ανιονικά τασιενεργά, αρωματικές μίνες.

Οι υγρές πολυμερικές επικαλύψεις χαρακτηρίζονται από ιδιότητες που διαφέρουν αρκετά από τις στερεές επικαλύψεις. Ο **μηχανισμός απορρόφησης** λαμβάνει χώρα στις **υγρές πολυμερικές επικαλύψεις** και οι αναλύτες απορροφούνται από τα μόρια του πολυμερικού υλικού στο εσωτερικό της ίνας. Εάν το υγρό πολυμερές που επικαλύπτει την ίνα διαθέτει λεπτό πάχος και οι αναλύτες χαρακτηρίζονται από υψηλό συντελεστή διάχυσης, επιτρέπεται στα μόρια να διεισδύσουν στις εσωτερικές στρώσεις της ίνας σε λογικό χρόνο εκχύλισης^[7,17].

Στη περίπτωση που το **ροφητικό μέσο είναι στερεό** με πυκνή κρυσταλλική δομή εμφανίζει μειωμένους συντελεστές διάχυσης. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι λαμβάνει χώρα **μηχανισμός προσρόφησης** των αναλυτών στην επιφάνεια του ροφητικού μέσου μέσα σε λογική χρονική περίοδο εκχύλισης. Αυτού του είδους η ίνα διαθέτει περιορισμένη επιφάνεια για ρόφηση αναλυτών, με αποτέλεσμα να δεσμεύονται αμέσως οι ενεργές θέσεις και να λαμβάνουν χώρα φαινόμενα ανταγωνισμού-ανταλλαγής (displacement effects) κάτι που δε παρατηρείται στην περίπτωση της απορρόφησης των αναλυτών. Έτσι, οι αναλύτες ανταγωνίζονται για τις κενές θέσεις και η ποσότητα που εκχυλίζεται εφόσον αποκατασταθεί ισορροπία διαφέρει ανάλογα με τις συγκεντρώσεις στο δείγμα των ενώσεων-στόχων και μη. Ένας τρόπος για να ξεπεραστεί ο θεμελιώδης αυτός περιορισμός του πορώδους στερεού ροφητικού μέσου είναι η εφαρμογή μικρότερου χρόνου από το χρόνο αποκατάστασης της ισορροπίας έτσι ώστε το συνολικό ποσό των αναλυτών που

συσσωρεύεται πάνω στην ίνα να είναι σημαντικά χαμηλότερη από την τιμή κορεσμού^[7,17].

7.2.2 Επιλογή ίνας

Η επιλογή του προσροφητικού υλικού (στατική φάση) είναι μία δύσκολη απόφαση κυρίως στην περίπτωση αντιμετώπισης ενώσεων που διαφέρουν στην πολικότητα και στην πτητικότητα. Ο κλασικός κανόνας που ακολουθείται στην επιλογή της στατικής φάσης είναι «όμοια διαλύουν όμοια» όμως δεν είναι αρκετό για να οδηγήσει πάντα στη σωστή επιλογή. Οι σύγχρονες πολυμερικά επικαλυμμένες τριχοειδείς ίνες από τηγμένο διοξείδιο του πυριτίου οι οποίες είναι εμπορικά διαθέσιμες χαρακτηρίζονται ως γενικής επιλεκτικότητας βάση των διαφορών της πολικότητας και της πτητικότητας των ενώσεων-στόχων. Εκτός από τις ήδη υπάρχουσες επιλογές, είναι δυνατή η δημιουργία νέων πολυμερικών ινών συγκεκριμένης επιλεκτικότητας καθώς αναπτύσσονται για την αναγνώριση και προσρόφηση συγκεκριμένων ενώσεων (“custom – made” fibres). Τέλος, για πολύ πτητικά συστατικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ίνες οι οποίες φέρουν μεγαλύτερη ποσότητα πολυμερικού υλικού, ενώ για τα ελάχιστα πτητικά συστατικά ίνες που φέρουν τη μικρότερη δυνατή ποσότητα πολυμερικού υλικού. Στην πρώτη περίπτωση είναι συχνά αναγκαίος μεγαλύτερος χρόνος για την επίτευξη ισορροπίας. Η ικανότητα της ίνας να συγκρατεί αποτελεσματικότερα τα πτητικά συστατικά είναι δυνατό να βελτιωθεί με τη μεταβολή διαφόρων παραγόντων. Οι κυριότεροι από αυτούς είναι η θερμοκρασία, ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη ισορροπίας, ο χρόνος που η ίνα παραμένει σε επαφή με το δείγμα ή την υπερκείμενή του αέρια φάση, η ποσότητα του δείγματος, καθώς και το μέγεθος του φιαλιδίου^[6,38,39].

Συνοψίζοντας, η επιλογή της καταλληλότερης ίνας κατά την εφαρμογή της τεχνικής SPME είναι ιδιαίτερης σημασίας αφού σε αυτή στηρίζεται η επιτυχία της μεθόδου. Η επιλογή της ίνας που θεωρείται κάθε φορά κατάλληλη και στοχεύει στη λήψη αποτελεσμάτων υψηλής ευαισθησίας, ακρίβειας και επαναληπτικότητας, γίνεται με βάση^[6,38,39]:

→ Η επιλογή του είδους του πολυμερούς εξαρτάται από:

- το μοριακό βάρος των ενώσεων των οποίων επιδιώκεται η εκχύλιση, και
- τη συγγένεια που εμφανίζουν τα συστατικά του δείγματος λόγω της πολικότητάς τους ως προς το προσροφητικό υλικό που φέρει η ίνα.

→ Η επιλογή του πάχους της πολυμερικής επικάλυψης εξαρτάται από:

- την πτητικότητα που εμφανίζουν οι αναλύτες

7.2.2.1 PDMS

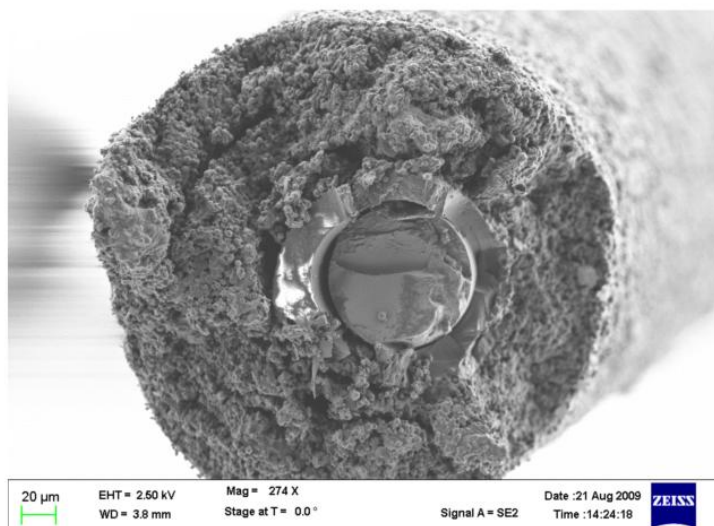
Η πιο δημοφιλής πολυμερική ίνα που χρησιμοποιείται συνεχώς στην τεχνική της μικροεκχύλισης στερεής φάσης είναι η επικαλυμμένη ίνα από Πολύ(διμεθυλοσιλοξάνιο) PDMS και διαθέτει τα παρακάτω γνωρίσματα^[17, 40]

- Είναι εμπορικά διαθέσιμη
- Είναι γενικής επιλεκτικότητας
- Διαθέτει τραχειά υγρή πολυμερική επίστρωση η οποία αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες του εγχυτήρα (injector) του αέριου χρωματογράφου (GC) που η θερμοκρασία κυμαίνεται άνω των 300 °C.
- Εφόσον είναι υγρό πολυμερές λαμβάνει χώρα μηχανισμός απορρόφησης.

- Είναι μη πολικό προσροφητικό υλικό και απευθύνεται κυρίως στην εκχύλιση μη πολικών ενώσεων σύμφωνα με τον κλασικό κανόνα. Παράλληλα όμως έχει την δυνατότητα ικανοποιητικής προσρόφησης και πολικών ενώσεων εάν πρωτίστως ρυθμιστούν κάποιες συνθήκες όπως το pH ή τη θερμοκρασία.

- Χαρακτηρίζεται ως εξαιρετικά υδρόφοβο απωθώντας την δέσμευση μορίων νερού.

- Οι ίνες PDMS διατίθενται στο εμπόριο σε τρία διαφορετικά πάχη το οποίο πρέπει να επιλέγεται κάθε φορά ανάλογα με τις ανάγκες τις εκχύλισης. Συνήθως, προτιμάται το λεπτότερο το οποίο όμως εξασφαλίζει τα ζητούμενα όρια ανίχνευσης (LOD) διότι όσο αυξάνεται το πάχος της πολυμερικής στρώσης αυξάνεται ανάλογα ο χρόνος ισορροπίας γεγονός που πρέπει να αποφεύγεται. Προτιμούνται λεπτότερες πολυμερικές ίνες για ενώσεις με μεγαλύτερους συντελεστές διάχυσης ώστε να παραμείνουν μικροί οι χρόνοι ισορροπίας. Ο γενικός κανόνας που ισχύει κατά την επιλογή του πάχους της πολυμερικής στρώσης της ίνας είναι: η χρήση όσον το δυνατόν λεπτότερου πάχους πολυμερούς το οποίο να εξασφαλίζει την απαραίτητη ευαισθησία ώστε η μέθοδος εκχύλισης να είναι αποτελεσματική και γρήγορη.



Εικ.7.2. Φωτογραφία SPME fiber PDMS από τον Prof. Dan Armstrong, U. Texas Arlington.

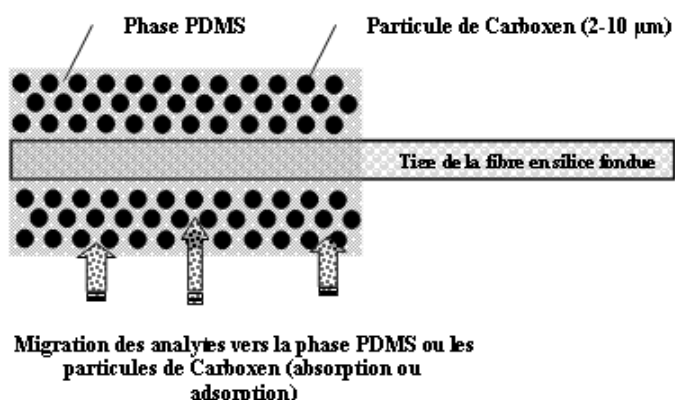
7.2.2.2 PA

Η πολυμερή υγρή ίνα από πολυακρυλικό εστέρα (Polyacrylate PA) είναι πολική ουσία και απευθύνεται σε πολικές ενώσεις π.χ. φαινόλες. Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι στερεό πολυμερές με χαμηλή πυκνότητα επιτρέποντας στις ουσίες να διαχέονται στην επικάλυψη μέσω μηχανισμού απορρόφησης. Οι πολυακρυλικοί εστέρες PA, χαρακτηρίζονται από χαμηλότερους συντελεστές διάχυσης σε σύγκριση με τα πολύ(διμεθυλοσιλοξάνια) PDMS, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται εκτενέστεροι χρόνοι εκχύλισης^[17,40].

7.2.2.3 Μικτές επιστρώσεις

Το PDMS συνδυάζεται πολλές φορές με διάφορα υλικά προκειμένου να αποκτήσει συγκεκριμένες ιδιότητες. Συνήθως συνδυάζεται με το **Carboxen**, το οποίο είναι ένα ανθρακικό μοριακό κόσκινο που έχει μακρο-, μεσο- και μικρο- πόρους, με συνέπεια ανάλογα με το μέγεθος να ελέγχεται το μέγεθος των σωματιδίων που

εισχωρούν σε αυτό, ενώ συγχρόνως βελτιώνει τη συγκράτηση των μικρών μορίων στο PDMS.

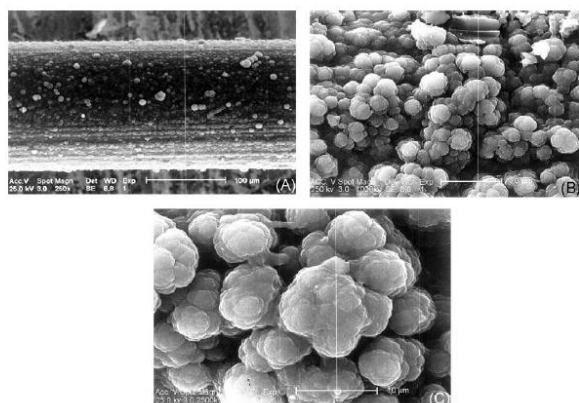


Εικ. 7.3. Απεικόνιση της ρόφησης των ενώσεων-στόχων από μικτή πολυμερική επίστρωση^[38].

Το υλικό **DVB (PDMS-divinylbenzene)**, ως στερεό πολυμερές, έχει μεγαλύτερους πόρους από το Carboxen με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται για τη συγκράτηση των μεγαλύτερων και λιγότερο πτητικών μορίων. Ο συνδυασμός DVB/CAR/PDMS καθιστά δυνατή τη συγκράτηση όλων των μορίων ανεξαρτήτως μεγέθους. Αποτελείται από στρώμα PDMS/Carboxen που καλύπτεται από στρώμα PDMS/DVB. Τα μικρά μόρια, που έχουν μεγαλύτερο συντελεστή διάχυσης, προσεγγίζουν το εσωτερικό στρώμα ταχύτερα με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η συγκράτηση των μεγαλύτερων στο εξωτερικό στρώμα. Ο συνδυασμός Carbowax/DVB αποτελεί το πιο πολικό υλικό και είναι κατάλληλο για πολικές ενώσεις^[38,42].

Πολλές φορές τα ήδη υπάρχοντα εμπορικά πολυμερή υλικά αδυνατούν να ανιχνεύσουν κάποιες ενώσεις-στόχους ή λόγω της ευρείας επιλεκτικότητάς τους ανιχνεύουν και πολλές άλλες παρευρισκόμενες ενώσεις. Γι' αυτό το λόγο γίνονται πολλές προσπάθειες για την εύρεση νέων πολυμερών υλικών, τα οποία εναποτίθενται πάνω στην ίνα της SPME με δύο κυρίως τεχνικές. Η πρώτη είναι με βάπτιση της

ίνας σε οργανικό διάλυμα (dipping technique) όπου το πολυμερές υλικό συνδέεται με το υλικό του σκελετού της ίνας σταυρωτά (crosslinked) ενώ η δεύτερη είναι με ηλεκτροεναπόθεση (electrodeposit) κατά την οποία το πολυμερές εναποτίθεται το υλικό πάνω σε μεταλλική ίνα. Ο Naader Alizadeh και οι ομάδα του χρησιμοποίησαν την δεύτερη τεχνική για την εναπόθεση του πολυμερούς υλικού dodecylsulfate-doped polypyrrole (PPy-DS) πάνω σε ίνα από πλατίνα. Η ίνα αυτή έφερε εξαιρετικά αποτελέσματα για την εκχύλιση 8 ΠΑΥ με τη μέθοδο headspace-SPME ενώ ταυτόχρονα έδειξε ανθεκτικότητα στις υψηλές θερμοκρασίες κατά την εκρόφιση^[38,39,42].



Εικ. 7.4. Μεγέθυνση της ίνα από πολυμερές υλικό dodecylsulfate-doped polypyrrole (PPy-DS) κατασκευασμένη από τον Naader Alizadeh^[39].

7.3 Μηχανισμός Απορρόφησης – Προσρόφησης

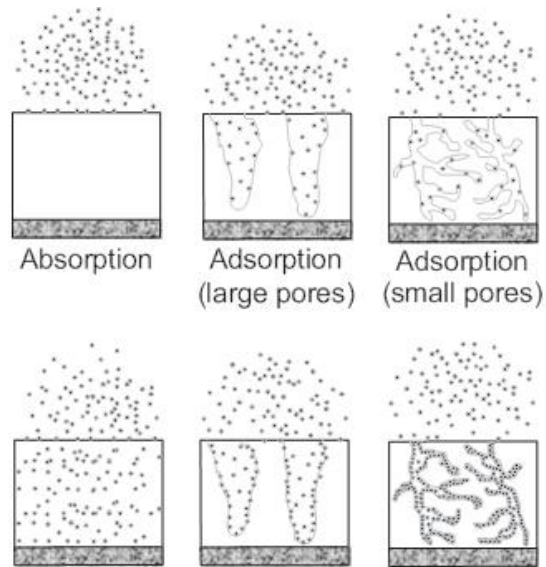
Η μέθοδος μικροεκχύλιση σταθερής φάσης δίνει την εντύπωση ότι η εκχυλιζόμενη φάση είναι πάντα στερεή ενώ στην πραγματικότητα υπάρχουν στερεά και υγρά υλικά επικάλυψης της ίνας που είναι κατασκευασμένη από τηγμένο διοξείδιο του πυριτίου (fused silica). Το όνομα αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι πρώτες προσπάθειες είχαν γίνει με στερεή ίνα από τηγμένο διοξείδιο του πυριτίου και στο γεγονός ότι οπτικά όλα τα είδη ινών φαίνονται σαν στερεά. Επομένως, τα

πολυμερικά υλικά που φέρουν οι ίνες είναι είτε υγρά πολυμερή στα οποία λαμβάνει χώρα μηχανισμός απορρόφησης είτε στερεά πολυμερή που κυριαρχεί ο μηχανισμός προσρόφησης^[6,7].

Η SPME βασίζεται στις αρχές ισορροπίας των αναλυτών μεταξύ μιας φάσης δότη και μιας φάσης δέκτη μέσω μηχανισμού είτε απορρόφησης είτε προσρόφησης. Η διαδικασία της εκχύλισης και στις δύο περιπτώσεις ξεκινάει με προσρόφηση των αναλυτών στην επιφάνεια της φάσης δέκτη και έπειτα ή θα ακολουθήσει η διάχυση τους προς το εσωτερικό της ίνας ή απλά θα καταληφθούν όλες οι ενεργές θέσεις στην επιφάνεια της. Εάν το υλικό επικάλυψης της ίνας είναι υγρό και οι αναλύτες διαθέτουν υψηλό συντελεστή διάχυσης μετά την αρχική προσρόφηση των αναλυτών στην επιφάνεια της ίνας θα ακολουθήσει απορρόφησης τους στο εσωτερικό της ίνας. Στη περίπτωση που η ίνα είναι επικαλυμμένη με στερεό υλικό και οι αναλύτες διαθέτουν χαμηλό συντελεστή διάχυσης μετά την αρχική προσρόφηση δεν παρατηρείται απορρόφηση καθώς οι αναλύτες παραμένουν στην επιφάνεια της ίνας. Συνεπώς στην δεύτερη περίπτωση που λαμβάνει χώρα μόνο προσρόφηση μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα που έχουν καταληφθεί όλες οι ενεργές θέσεις στην επιφάνεια της ίνας παρατηρούνται φαινόμενα ανταλλαγής^[6,7].

Η γραμμικότητα της ισόθερμης καμπύλης που αντιστοιχεί στο μηχανισμό απορρόφησης εκτείνεται σε μεγαλύτερο φάσμα συγκέντρωσης των αναλυτών, εφόσον η ικανότητα της ίνας δεν αλλάζει μέχρι που η εκχυλιζόμενη ποσότητα να ισούται με το 1% του βάρους της εκχυλιζόμενης φάσης. Αντίθετα, η ισόθερμη καμπύλης που αντιστοιχεί στο μηχανισμό προσρόφησης δεν είναι γραμμική για υψηλές συγκεντρώσεις αναλυτών στην ίνα καθώς γρήγορα εμφανίζονται φαινόμενα ανταλλαγής. Επομένως, προτιμούνται τα υγρά υλικά επικάλυψης της ίνας καθώς μπορούν να εφαρμοστούν για την εκχύλιση δειγμάτων υψηλής συγκέντρωσης.

Παρόλα αυτά, τα στερεά υλικά επικάλυψης προτιμούνται για πολικούς πτητικούς αναλύτες λόγω του ότι εμφανίζουν μεγαλύτερη επιλεκτικότητα έναντι αυτού του είδους των ενώσεων^[6,7].



Εικ. 7.5. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού απορρόφησης και προσρόφησης (προσρόφηση με μεγάλους και μικρούς πόρους) ^[7]

8^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΟΝΤΙΚΗΣ ΙΣΧΥΟΣ, pH & ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ SPME.

8.1 Επίδραση ιοντικής ισχύος

Η αύξηση της ιοντικής ισχύος ευνοεί τη μεταφορά των αναλυτών στον υπερκείμενο χώρο και στη συνέχεια στην πολυμερική ίνα, το φαινόμενο αυτό ονομάζεται εξαλάτωση (salting out effect). Το γεγονός αυτό εξηγείται με την δέσμευση περισσότερων μορίων νερού στις εφυδατωμένες σφαίρες γύρω από το ιοντικό αλάτι. Αυτές οι εφυδατωμένες σφαίρες ελαττώνουν τη συγκέντρωση του νερού που είναι διαθέσιμο για να διαλύει τα μόρια των αναλυτών αυξάνοντας έτσι τις διαλυτότητες των μη πολικών ή ασθενώς πολικών οργανικών αναλυτών. Συνεπώς, αναμένεται ότι με αυτόν τον τρόπο θα οδηγούνται επιπλέον αναλύτες στον υπερκείμενο χώρο και συνεπώς το εκχυλιστικό μέσο θα προσροφά μεγαλύτερο ποσοστό αναλυτών^[11,21].

Με απλούστερα λόγια, η προσθήκη ποσότητας άλατος στη μήτρα οδηγεί σε μείωση της διαλυτότητας των ενώσεων προς ανάλυση που δεν είναι ηλεκτρολύτες και σε αύξηση της σταθεράς Henry, αυξάνοντας τη συγκέντρωσή τους στην υπερκείμενη φάση. Το φαινόμενο της εξαλάτωσης εξαρτάται από το **είδος της ένωσης** και από το **τύπο των ιόντων του άλατος** (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , SO_4^{2-}) που βρίσκονται στην υδατική φάση. Είναι αποδεδειγμένο ότι το φαινόμενο της εξαλάτωσης είναι πιο ενισχυμένο όταν η διαλυμένη ουσία είναι μεγάλη, άπολη οργανική ένωση. Το φαινόμενο είναι ασθενέστερο στην περίπτωση όπου η διαλυμένη ουσία εμφανίζει πολικότητα και είναι μικρή σε μέγεθος^[11,21].

Στη περίπτωση όπου οι ενώσεις προς ανάλυση είναι ηλεκτρολύτες και βρίσκονται στη δισταμένη τους μορφή τότε παρατηρείται το αντίθετο φαινόμενο, το οποίο ονομάζεται εναλάτωση (salting in effect). Το φαινόμενο αυτό, προκαλεί αύξηση της διαλυτότητας των αναλυτών με αποτέλεσμα μείωσης της συγκέντρωσής τους στην υπερκείμενη φάση. Επομένως, για τον έλεγχο της επίδρασης της προσθήκης άλατος στην αποτελεσματικότητα της SPME θα πρέπει, πρώτα, όλες οι ενώσεις προς ανάλυση να βρίσκονται στην ουδέτερή τους μορφή^[11,21].

Μεταβάλλοντας την ιοντική ισχύς των διαλυμάτων με την προσθήκη συγκεκριμένων ποσοτήτων άλατος, παρατηρείται η πιθανή θετική ή αρνητική επίδραση της ιοντικής ισχύος. Πάντα όμως υπάρχει και η περίπτωση όπως όταν οι ενώσεις-στόχοι είναι ΠΑΥ η αλλαγή στην ιοντική ισχύς του διαλύματος να μην φέρει κάποια επίδραση στην αποτελεσματικότητα της SPME. Η αύξηση της ιοντικής ισχύς του διαλύματος γίνεται με την προσθήκη είτε χλωριούχου νατρίου είτε θεικού νατρίου με αποτέλεσμα τη μείωση της διαλυτότητας των οργανικών ενώσεων που εμφανίζουν πολικότητα^[11] και την αύξηση των συντελεστών κατανομής τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι το φαινόμενο της εξαλάτωσης αυξάνει εκθετικά με αυξανόμενη τη συγκέντρωση του άλατος. Η σταθερά Setschenow K^s για μία συγκεκριμένη οργανική διαλυμένη ουσία και η συγκέντρωση του άλατος στο διάλυμα μπορούν να προσδιοριστούν πειραματικά. Μια εμπειρική σχέση που συνδέει την διαλυτότητα με και χωρίς την παρουσία αλάτων είναι η ακόλουθη^[2]:

$$\log\left[\frac{S_w^{sat}}{S_{w,sat}^{sat}}\right] = K^s [\text{salt}]_t$$

$$K^s = \sum K_i^s x_i$$

$[\text{salt}]_t$ = η ολική συγκέντρωση των αλάτων και

K^s = σταθερά Setschenow η οποία προκύπτει από το άθροισμα των συνεισφορών όλων των παρόντων αλάτων

Η προσθήκη άλατος ενισχύει το φαινόμενο της εξαλάτωσης έως ενός σημείου. Έχει παρατηρηθεί ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος τα ανιόντα (συνήθως τα χλωρο-ανιόντα) σχηματίζουν μία στοιβάδα στην επιφάνεια του διαλύματος, εμποδίζοντας την μεταφορά των οργανικών ενώσεων προς την υπερκείμενη αέρια φάση. Ένα επιπλέον μειονέκτημα που συνοδεύει την μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος στο διάλυμα είναι το γεγονός ότι μετά την εκρόφηση στο αναλυτικό όργανο της ίνας από πολυμερές που χρησιμοποιείται στη SPME γίνεται πιο εύθραυστη και η μη προσεκτική έκπληση της πιθανότατα να οδηγήσει σε καταστροφή της^[21,43].

8.2 Επίδραση pH

Η τιμή του pH του δείγματος κατέχει σπουδαίο ρόλο για τις ελαφρώς όξινες ή βασικές ενώσεις για την ευαισθησία και την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας της SPME. Γενικά, η τροποποίηση του pH κατά την βελτιστοποίηση της μεθόδου είναι σημαντικότερη για την HSSPME και όχι τόσο στην απευθείας SPME καθώς σε ακραίες τιμές pH του δείγματος μπορεί να προκαλέσει ανεπανόρθωτη καταστροφή στην ίνα. Για παράδειγμα, οι ίνες PDMS δεν μπορούν να εκτεθούν σε ένα δείγμα με pH κάτω από 4 ή άνω του 10^[16].

Η τιμή του pH της μήτρας καθορίζει εάν οι πολικές ενώσεις θα λάβουν την δισταμένη ή την αδιάστατη μορφή τους και ανάλογα να ενισχύσει ή όχι την εκχυλιζόμενη ποσότητα στην ίνα. Στη περίπτωση των όξινων ενώσεων το pH πρέπει να είναι δύο μονάδες χαμηλότερο από την τιμή του pKa ενώ στην περίπτωση των βασικών ενώσεων το pH πρέπει να είναι δύο μονάδες υψηλότερο από την τιμή του pKb. Εάν όμως οι αναλύτες είναι άπολες ενώσεις όπως οι ΠΑΥ, μένουν ουδέτερες για οποιαδήποτε τιμή του pH και η μεταβολή του δεν φέρει κάποια επίδραση στην

ευαισθησία της HSSPME και γι' αυτό δεν λαμβάνεται υπόψη κατά την βελτιστοποίηση της μεθόδου^[16].

8.3 Επίδραση Θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η εκχύλιση επηρεάζει την κινητική της και την ευαισθησία της μεθόδου. Η αύξηση της θερμοκρασίας ενισχύει την διάχυση των αναλυτών από την μήτρα προς την ίνα στην απευθείας SPME και την διάχυση από το δείγμα προς τον υπερκείμενο χώρο στην SPME. Μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός κατά το οποίο η αύξηση της θερμοκρασίας κατά την εκχύλιση μειώνει τη σταθερά κατανομής του εκάστοτε αναλύτη. Συνεπώς, η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί^[6,17,41]:

- αύξηση του ρυθμού εκχύλισης αφού αυξάνει τον συντελεστή διάχυσης των ημιπτητικών αναλυτών προς την ίνα και τον υπερκείμενο χώρο.
- μείωση της συνολικής ποσότητας που εκχυλίζεται από την ίνα λόγω της μείωσης της σταθεράς κατανομής των αναλυτών μειώνοντας έτσι την ευαισθησία της μεθόδου. Αυτό το φαινόμενο οφείλεται στο ότι η διαδικασία της ρόφησης είναι εξώθερμο φαινόμενο ($q > 0$).

Η εξάρτηση της σταθεράς κατανομής από τη θερμοκρασία του δείγματος ή της ίνας όταν το δείγμα και η ίνα μεταβαίνουν από τη θερμοκρασία T στο T_0 , δίνεται από την εξίσωση:

$$k_{fs} = k_0 \exp - \frac{\Delta H}{R} \left[\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right]$$

k_0 : σταθερά κατανομής του αναλύτη όταν η ίνα και το δείγμα βρίσκονται σε θερμοκρασία T_0

ΔH : η μεταβολή της ενθαλπίας του αναλύτη κατά την μετακίνησή του από το δείγμα στην ίνα.

T_0 : η αρχική θερμοκρασία (K)

T : η αρχική θερμοκρασία (K)

R: σταθερά ιδανικών αερίων

Η ενθαλπία που χαρακτηρίζει την SPME θεωρείται σταθερή για διαφορετικές θερμοκρασίες στις τυπικές πειραματικές δοκιμές της SPME. Η σταθερά κατανομής για ένα αναλύτη που είναι μεγαλύτερη της μονάδας σημαίνει ότι αυτός ο αναλύτης θα έχει λιγότερη ενέργεια όταν βρίσκεται στην ίνα από ότι όταν είναι στο δείγμα. Επομένως η διαδικασία μεταφοράς του αναλύτη στην ίνα είναι εξώθερμη διεργασία^[6,17,41].

Το μειονέκτημα της μείωσης της σταθεράς κατανομής κατά την αύξηση της θερμοκρασίας κατά την εκγύλιση υπερνικάται με την χρήση μίας πρωτοποριακής ίνας η οποία εσωτερικά ψύχεται ενώ όλο το υπόλοιπο σύστημα θερμαίνεται, η εφεύρεση αυτή ονομάζεται “Cold-fiber” και προήλθε από την επιστημονική ομάδα του J.Pawliszyn. Γενικά, η υπερβολική αύξηση της θερμοκρασίας όχι μόνο μειώνει τη σταθερά κατανομής αλλά ταυτόχρονα μπορεί να αλλοιώσει τα συστατικά της μήτρας και να κλονίσει τη μοριακή σταθερότητα των αναλυτών. Η θέρμανση του δείγματος και η ταυτόχρονη ψύξη της ίνας δημιουργεί ένα θερμοκρασιακό διάκενο ανάμεσα στην ίνα και στο γύρω της περιβάλλον συντελώντας στην σημαντική αύξηση της σταθεράς κατανομής του αναλύτη για την ίνα ενώ ταυτόχρονα ενισχύει την απελευθέρωση της ίνας από την μήτρα προς τον υπερκείμενο χώρο^[41].

Ο J.Pawlyszyn et. al. χρησιμοποίησε το “Cold-Fiber” κατά την διαδικασία της μικροεκχύλισης στερεής φάσης από τον υπερκείμενο χώρο του δείγματος. Οι εκχυλιζόμενες ουσίες ήταν μια σειρά πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων που διαθέτουν διαφορετικά σημεία ζέσεως. Η εκχυλιζόμενη ποσότητα ενώσεων με υψηλά σημεία ζέσεως (ανθρακένιο, φλουορανθένιο, πυρένιο) αυξάνεται σε θερμοκρασίες άνω των 100 °C. Μείωση της εκχυλιζόμενης ποσότητας ενώσεων με χαμηλά σημεία ζέσεως παρατηρήθηκαν για θερμοκρασίες άνω των 150 °C καθώς η υπερβολική αύξηση της θερμοκρασιακής διαφοράς μεταξύ υπερκείμενου χώρου και ίνας προκαλεί μείωση της ικανότητας ρόφησης ενώσεων με χαμηλά σημεία ζέσεως από το υλικό επικάλυψης της ίνας^[41].

Η τεχνική του “Cold-Fiber” ανατρέπει την αντίσταση στην μεταφορά μάζας από τη μήτρα στην υπερκείμενη φάση ενώ ταυτόχρονα αυξάνει την εκχυλιζόμενη ποσότητα πάνω στην ίνα δηλαδή ενισχύει την ευαισθησία της μεθόδου. Παρόλα αυτά αυτή η μέθοδος έχει θερμοκρασιακό περιορισμό ο οποίος πρέπει να εντοπιστεί κατά τη βελτιστοποίηση της μεθόδου. Παράλληλα, χαρακτηρίζεται από υψηλό κόστος και απαιτεί ειδικό εισαγωγέα καθώς η σύριγγα του cold-fiber διαθέτει διαφορετικές διαστάσεις από την κλασική σύριγγα-SPME^[41].

9^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ SPME.

9.1 Θεωρία Ανάδευσης

Η επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης του δείγματος κατά την εκχύλιση του είναι καταλυτική αφού διευκολύνει την μεταφορά της μάζας από το διάλυμα στην ίνα. Στην περίπτωση της SPME από την υπερκείμενη φάση η ανάδευση δεν αναμιγνύει μόνο την υδατική φάση (μήτρα) αλλά ταυτόχρονα ομογενοποιεί την υπερκείμενη αέρια φάση. Αυτό οδηγεί σε αισθητή μείωση του χρόνου που απαιτείται για να επέλθει ισορροπία στο σύστημα καθώς ενισχύεται η διάχυση των αναλυτών από την μήτρα προς την ίνα. Τα θετικά αποτελέσματα της ανάδευσης στην εκχύλιση εμφανίζονται όταν οι ενώσεις-στόχοι είναι **ημιπτητικές** οι οποίες διαθέτουν χαμηλές σταθερές κατανομής μεταξύ υπερκείμενης φάσης και της ίνας (k_{FH}) και χαρακτηρίζονται από παρατεταμένους χρόνους ισορροπίας. Η ανάδευση λοιπόν στους ημιπτητικούς αναλύτες συντομεύει τους χρόνους ισορροπίας. Αν οι ουσίες είναι πολύ **πτητικές** οι χρόνοι εκχύλισης είναι πολύ μικροί και στην στατική περίπτωση και δεν απαιτούν την χρήση ανάδευσης. Συνεπώς η ανάδευση αυξάνει την μεταφορά μάζας προς την ίνα και μειώνει το χρόνο ισορροπίας για ενώσεις-στόχους με χαμηλές σταθερές κατανομής μεταξύ υπερκείμενης φάσης και της ίνας (k_{FH}).

Στην απευθείας SPME ο χρόνος εκχύλισης εξαρτάται από την διάχυση των αναλυτών μέσα στο δείγμα και μέσα στη στατική στρώση (depletion zone) που περιβάλλει την ίνα. Όσο παχύτερη είναι αυτή η στρώση τόσο παρατηρούνται εκτενέστεροι χρόνοι ισορροπίας. Η χρήση ανάδευσης μειώνει αρκετά το πάχος αυτού του υδάτινου στρώματος. Έτσι, οι χρόνοι ισορροπίας μειώνονται καθώς εξαρτώνται μόνο από την διάχυση των αναλυτών μέσω του λεπτού στρώματος προς την ίνα^[12,13].

9.2 Μορφές ανάδευσης

Η μεταφορά των αναλυτών από το δείγμα στην ίνα κατά την διαδικασία της εκχύλισης χωρίς την χρήση ανάδευσης «στατική εκχύλιση» γίνεται μόνο μέσω της διάχυσης οδηγώντας σε μία πολύ αργή διαδικασία. Η χρήση οποιασδήποτε μορφής ανάδευσης συντομεύει την όλη διαδικασία. Η στατική έκδοση της SPME χρησιμοποιείται επιτυχώς στην περίπτωση που το δείγμα είναι αέριο και όταν η αναλύτες είναι πτητικοί. Για την ανάδευση του μείγματος κατά την εφαρμογή της SPME έχουν δοκιμαστεί διάφορες τεχνικές με ποικίλα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Οι πιο σημαντικές τεχνικές ανάδευσης είναι: η μαγνητική ανάδευση (magnetic stirring), η μηχανική ανάδευση (vortex), η κίνηση της ίνας (fiber movement), διαμέσου ροής (flow through) και υπέρηχοι (sonication)^[44].

Η **μαγνητική ανάδευση** χρησιμοποιείται περισσότερο από τις άλλες τεχνικές καθώς συγκεντρώνει πολλά πλεονεκτήματα. Θεωρείται απαραίτητος και κλασικός εξοπλισμός για όλα τα εργαστήρια και συνδυάζεται με όλες της μορφές της SPME (απευθείας, υπερκείμενης φάσης, προστατευτικής μεμβράνης) ενώ ταυτόχρονα έχει άριστη απόδοση. Επίσης αυτού του τύπου η ανάδευση δεν περιορίζεται από το μέγεθος του δείγματος, είναι αποτελεσματική και για μικρές και για μεγάλες ποσότητες. Οι γρήγοροι ρυθμοί της ανάδευσης αυξάνουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου μόνο αν διατηρείται σταθερή η ταχύτητα περιστροφής του μαγνήτη και η θερμοκρασία της μαγνητικής πλάκας κατά την διάρκεια της διεργασίας^[44].

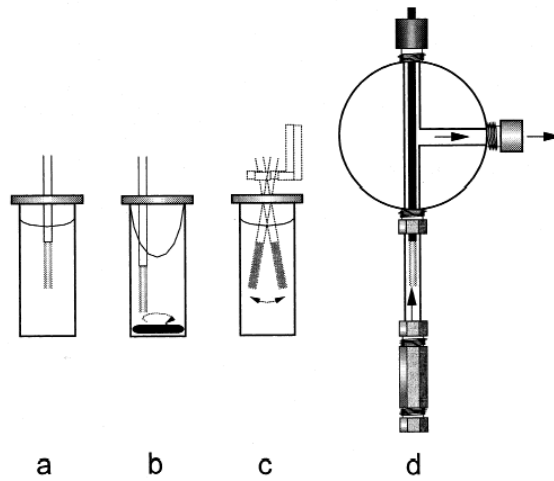
Η εταιρία Varian εμπορευματοποίησε πρόσφατα ένα νέο αυτόματο δειγματολήπτη SPME που χρησιμοποιεί **κίνηση της ίνας** κατά την εκχύλιση που παρέχει την δυνατότητα για αναλύσεις ρουτίνας. Το αποτέλεσμα της χρήσης αυτού του δειγματολήπτη είναι θετικό καθώς αύξησε την αποτελεσματικότητα της μεθόδου και μείωσε τον χρόνο ισορροπίας χωρίς την χρήση μαγνήτη μέσα στο δείγμα. Το

αποτέλεσμα παρόλα αυτά είναι παρόμοιο με την χειροκίνητη SPME που χρησιμοποιεί μαγνητική ανάδευση. Τα μεγάλα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η μεγάλη πίεση που δέχεται η ίνα και μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή της και ο περιορισμός αυτής της μεθόδου μόνο σε μικρά δείγματα^[44].

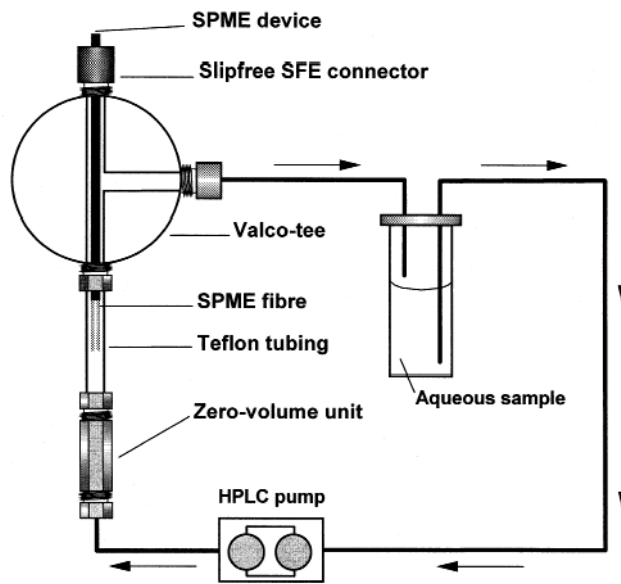
Η ανάδευση **διαμέσου ροής** έφερε και αυτή παρόμοια αποτελέσματα με την κίνηση της ίνας. Η θεωρία αυτής της τεχνικής βασίζεται στο γεγονός ότι το στατικό στρώμα που περιβάλλει την ίνα είναι πολύ λεπτό εφόσον επιτυγχάνεται υψηλή γραμμική ροή. Το μόνο που πρέπει να ελέγχεται είναι η πιθανή επιμόλυνση του δείγματος και η διατήρηση σταθερής ροής^[44].

Η εφαρμογή **μηχανικής ανάδευσης** οδηγεί σε καλή απόδοση χωρίς την χρήση μαγνήτη μέσα στην δειγματοληπτική μεμβράνη. Η μεγάλη πίεση που δέχεται η ίνα κατά την τεχνική αυτή αποτελεί αρνητικό παράγοντα^[44].

Η **χρήση υπέρηχων** για την ανάδευση του δείγματος συνδυάζει την ανάμιξη της υδάτινης μήτρας και την κίνηση της ίνας, οδηγώντας σε εξαιρετικά αποτελέσματα. Αυτή όμως η τεχνική χαρακτηρίζεται από ένα μεγάλο μειονέκτημα. Η χρήση υπέρηχων θερμαίνει το δείγμα κατά την διάρκεια της SPME με αποτέλεσμα να προκαλεί διάσπαση των αναλυτών που είναι θερμικά ευαίσθητοι. Αυτό οδηγεί στην μείωση της συνολικής ποσότητας που εκχυλίζεται και σε μείωση της αποτελεσματικότητας όλης της μεθόδου^[12,44].



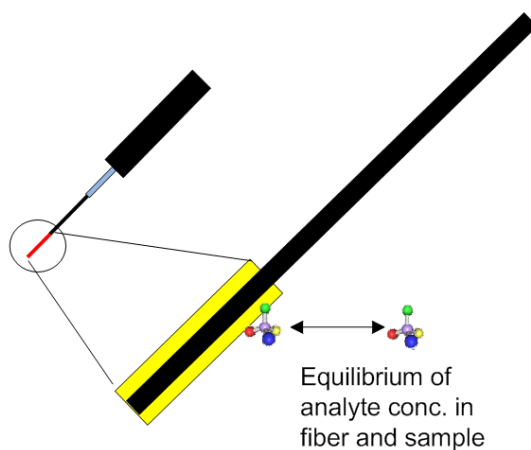
Εικ. 9.1. Τρόποι ανάδευσης κατά την διάρκεια της SPME: a) στατική εκχύλιση b) μαγνητική ανάδευση c) ανάδευση με κίνηση της ίνας d) ανάδευση διαμέσου ροής (on-line flow through cell extraction)^[44]



Εικ. 9.2. Συσκευή ανάδευσης διαμέσου ροής (on-line flow through cell extraction)^[44]

10^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ (ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ)



Εικ. 10.1. Απεικόνιση ενός συστήματος SPME σε κατάσταση ισορροπίας.

10.1 Ορισμός χρόνου εκχύλισης (ισορροπίας)

Η μικροεκχύλιση στερεής φάσης βασίζεται στην ισορροπία κατανομής των ουσιών μεταξύ της μήτρας του δείγματος, της υπερκείμενης φάσης, αν υπάρχει, και του υλικού επικάλυψης της ίνας. Έτσι, μετά το πέρας του χρόνου που απαιτείται για την αποκατάσταση της θερμοδυναμικής ισορροπίας το σύστημα παραμένει σταθερό και δεν παρατηρούνται μεταβολές στη μεταφορά της μάζας. Εάν ο χρόνος εκχύλισης είναι πολύ μεγάλος είναι δυνατή η ανάλυση ουσίας που δεν έχει έρθει σε κατάσταση ισορροπίας. Το μόνο που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη είναι να παραμένουν σταθερά ο χρόνος εκχύλισης και η θερμοκρασία για να λαμβάνονται επαναλήψιμα αποτελέσματα^[17].

Επομένως, χρόνος εκχύλισης (ισορροπίας) **ορίζεται** ως ο χρόνος μετά τον οποίο η ποσότητα των εκχυλιζόμενων ουσιών παραμένει σταθερή και αντιστοιχεί μέσα στα όρια του πειραματικού σφάλματος, στην ποσότητα που εκχυλίζεται σε άπειρο χρόνο^[16,17].

Ο χρόνος εκχύλισης επηρεάζεται από την σταθερά κατανομής του εκάστοτε αναλύτη. Οι ενώσεις που διαθέτουν μεγάλη σταθερά κατανομής δηλαδή έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με την ίνα απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος για να επέλθει ισορροπία. Ο χρόνος εκχύλισης είναι συντομότερος για αναλύτες με μικρές σταθερές κατανομής καθώς λιγότερη ποσότητα μεταφέρεται στο υλικό επικάλυψης της ίνας^[16,17].

Ο χρόνος αποκατάστασης της θερμοδυναμικής ισορροπίας εξαρτάται από το βαθμό αντίστασης μεταφοράς της μάζας από τη μήτρα προς το υπερκείμενο χώρο ή προς την ίνα κυρίως για τους ημιπηκτικούς αναλύτες. Στην περίπτωση της HSSPME ο κύριος παράγοντας που επιδρά στο συνολικό χρόνο εκχύλισης είναι η δυσκολία διάχυσης των αναλυτών από την μήτρα στον υπερκείμενο χώρο. Στην απευθείας SPME ο χρόνος εκχύλισης εξαρτάται από την διάχυση των αναλυτών μέσα στο δείγμα λόγω ύπαρξης ενός λεπτού στατικού υδάτινου στρώματος γύρω από την ίνα. Ο χρόνος εκχύλισης και στις δύο περιπτώσεις μπορεί να βελτιωθεί με διάφορες τεχντροπίες όπως εφαρμογή ανάδευσης, θερμοκρασίας ή κενού^[6,7].

Ακόμη ο χρόνος εκχύλισης επηρεάζεται από το πάχος του πολυμερούς που επικαλύπτει την ίνα και από το βαθμό διάχυσης του αναλύτη στο εσωτερικό της ίνας. Όσο μικρότερο είναι το πάχος τόσο μικρότερος είναι ο χρόνος εκχύλισης^[6,7].

Η συγκέντρωση του δείγματος δεν επηρεάζει το χρόνο εκχύλισης. Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου ο χρόνος εκχύλισης βελτιστοποιείται για μία δεδομένη συγκέντρωση και είναι ίδιος για όλα τα προς ανάλυση δείγματα. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι το σύστημα να συμπεριφέρεται γραμμικά, δηλαδή οι σταθερές κατανομής να παραμένουν σταθερές κατά τις μεταβολές των συγκεντρώσεων^[6,7].

Συνοψίζοντας, ο αποδεκτός χρόνος εκχύλισης θεωρείται ο βραχύτερος χρόνος στον οποίο επιτυγχάνονται χαμηλά όρια ανίχνευσης και καλή επαναληψιμότητα^[6].

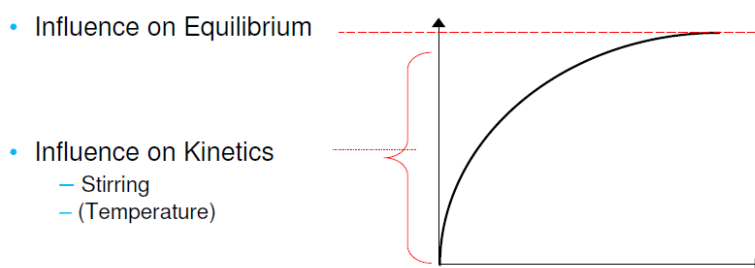
10.2 Χρόνος εκχύλισης υπό συνθήκες μειωμένης πίεσης-Επίδραση στην αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ των φάσεων του συστήματος.

Η μέθοδος HSSPME όπως ορίστηκε από τον Pawliszyn (1997) οδηγεί σε μία μείωση της μάζας των ενώσεων προς ανάλυση στο πολυμερικό στρώμα της ίνας και περιορίζεται στην εκχύλιση πτητικών ενώσεων^[16]. Η εφαρμογή συνθηκών μειωμένης πίεσης στο εσωτερικό της δειγματοληπτικής φιάλης κατά την διαδικασία της HSSPME όχι μόνο ενισχύει τη διάχυση των αναλυτών από την μήτρα προς την ίνα αλλά και επεκτείνει την εφαρμογή της μεθόδου και σε ημιπτητικές ενώσεις-στόχους. Συνεπώς, η VAC-HSSPME αυξάνει την μεταφορά μάζας προς την ίνα και μειώνει το χρόνο ισορροπίας για ημιπτητικές ενώσεις-στόχους επιταχύνοντας την εκχύλισή τους. Η συνθήκη μειωμένης πίεσης κατά την εκχύλιση αυξάνει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου μόνο αν διατηρείται σταθερή κατά την διάρκεια της διεργασίας.

Οι **ημιπτητικές** ενώσεις-στόχοι χαρακτηρίζονται από χαμηλό K'_H και διαθέτουν χαμηλές σταθερές κατανομής μεταξύ υπερκείμενης φάσης και μήτρας (k_{hs}) καθώς η αντίσταση στη μεταφορά μάζας προέρχεται κυρίως από την αέρια φάση. Έτσι, κατά την εκχύλισή τους με την μέθοδο HSSPME οδηγούν σε παρατεταμένους χρόνους ισορροπίας και μειωμένη ποσότητα που εκχυλίζεται από την ίνα. Η διαδικασία της εξάτμισης των ενώσεων-στόχων από την υδάτινη μήτρα στην υπερκείμενη αέρια φάση εξαρτάται από το συντελεστή μεταφοράς μάζας στην αέρια φάση (k_{hs}). Οι ημιπτητικές ενώσεις εξατμίζονται με αργό ρυθμό. Ο ρυθμός της εξάτμισης αυξάνεται με τη μείωση της πίεσης στην υπερκείμενη φάση με αποτέλεσμα η εφαρμογή κενού να επιδρά θετικά στην διαδικασία της HSSPME όταν οι αναλύτες είναι ημι-πτητικοί και η ισορροπία στο σύστημα να επέρχεται ταχύτερα.

Αν οι ουσίες είναι πολύ **πτητικές** οι χρόνοι εκχύλισης είναι ήδη πολύ μικροί και δεν παρατηρείται κάποια αξιοσημείωτη θετική επίδραση στην διαδικασία

εκχύλισής τους με την εφαρμογή κενού κατά την HSSPME. Αυτό συμβαίνει γιατί ο ρυθμός εξάτμισης τους είναι γρήγορος υπό ατμοσφαιρική πίεση και η αντίσταση στη μεταφορά μάζας προέρχεται κυρίως από την υδάτινη φάση και όχι από την αέρια. Επίσης, η κύρια δυσκολία της εκχύλισης πτητικών αναλυτών εντοπίζεται στην κατανομή των ενώσεων στο εσωτερικό του πολυμερούς που επικαλύπτει την ίνα λόγω του μικρού συντελεστή διάχυσης που τις χαρακτηρίζει και όχι στη μεταφορά μάζας μεταξύ των φάσεων.



Εικ. 10.2. Γραφική παράσταση της εκχύλισης μίας ένωσης-στόχου (άξονας x: χρόνος, άξονας y: εκχυλιζόμενη ποσότητα).

11^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΓΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ, ΕΚΧΥΛΙΣΤΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ & ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΗΣ ΦΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ SPME.

11.1 Επίδραση όγκου δείγματος

Η επιλογή του όγκου του δείγματος για την διαδικασία της SPME γίνεται βάση των σταθερών κατανομής των ενώσεων-στόχων μεταξύ του δείγματος και της ίνας (k_{fs}). Ο όγκος του δείγματος πρέπει να παραμένει σταθερός σε όλες τις δειγματοληψίες ώστε να λαμβάνονται αποτελέσματα με μεγάλη ακρίβεια^[20].

Στην περίπτωση της απευθείας SPME ο όγκος του δείγματος είναι ανάλογος της ποσότητας αναλυτών που εκχυλίζονται από την ίνα (n). Με την αύξηση του όγκου του δείγματος, η εκχυλιζόμενη ποσότητα εμπλουτίζεται. Αν ο όγκος του δείγματος είναι πολύ μεγαλύτερος από το γινόμενο της σταθεράς κατανομής της ουσίας με την ίνα: $k_{fs}V_f \ll V_s$, η ευαισθησία της μεθόδου δεν αυξάνεται με περαιτέρω αύξηση του όγκου του δείγματος. Η ποσότητα της εκχυλιζόμενης ουσίας είναι ανεξάρτητη από τον όγκο του δείγματος σύμφωνα με την προηγούμενη πρόταση και δεν χρειάζεται να καθοριστεί πριν την ανάλυση. Η εκχυλιζόμενη ποσότητα θα αντιστοιχεί κάθε φορά στη συγκέντρωση της ουσίας και θα είναι ανεξάρτητη του όγκου του δείγματος. Αυτό αποδεικνύεται και μαθηματικά^[17,20]:

Αν ισχύει $k_{fs}V_f \ll V_s$ τότε:

$$n = \frac{k_{fs}V_fV_sC_o}{k_{fs}V_f + V_s} \Rightarrow n = k_{fs}V_fC_o$$

Στη μέθοδο SPME υπερκείμενης φάσης οι σταθερές κατανομής k_{fh} και k_{hs} ορίζουν τον βαθμό επίδρασης του όγκου του δείγματος στην ποσότητα των ενώσεων που εκχυλίζονται. Εάν η αναλογία των όγκων δείγματος – υπερκείμενου χώρου

παραμένει σταθερή τότε το φαινόμενο εξάρτησης όγκου – εκχυλιζόμενης μάζας είναι εντονότερο για ενώσεις –στόχους με χαμηλά k_{hs} . Η μικρότερη ποσότητα όγκου δείγματος θεωρείται εκείνη που μπορεί να εξασφαλίσει ότι η εκχυλιζόμενη μάζα των αναλυτών ισούται λιγότερο από το 1% της αρχικής ποσότητας των αναλυτών στο δείγμα. **Ο προσδιορισμός αυτού του όγκου είναι εφικτός καθώς είναι ο όγκος που οδηγεί στην εκχύλιση της μισής ποσότητας από την αρχική ποσότητα των αναλυτών στο δείγμα.** Αυτό οδηγεί στο γεγονός ότι η ποσότητα των αναλυτών που παραμένουν στο δείγμα δεν παίζει κανένα ρόλο στην αποτελεσματικότητα της μεθόδου^[20].

Η κινητική της εκχύλισης από την υπερκείμενη αέρια φάση εξαρτάται κυρίως από την τάση να μεταφέρονται στην υπερκείμενη αέρια φάση δηλαδή από την σταθερά κατανομής των ουσιών από την μήτρα στον υπερκείμενο χώρο k_{hs} . Γι' αυτό το λόγο στην μέθοδο SPME από την υπερκείμενη φάση η εκχυλιζόμενη ποσότητα δεν εξαρτάται τόσο από την αναλογία των όγκων δείγματος – υπερκείμενου όγκου όσο από την τάση που χαρακτηρίζει τις ενώσεις-στόχους να μεταφέρονται στον υπερκείμενο χώρο. Σε περίπτωση που ο υπερκείμενος όγκος είναι πολύ μεγάλος και οι ενώσεις είναι πτητικές δηλαδή χαρακτηρίζονται από μεγάλες k_{hs} τότε οι ενώσεις προτιμούν να συσσωρεύονται στην υπερκείμενη φάση και αυτό έχει ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση στην ευαισθησία της μεθόδου.

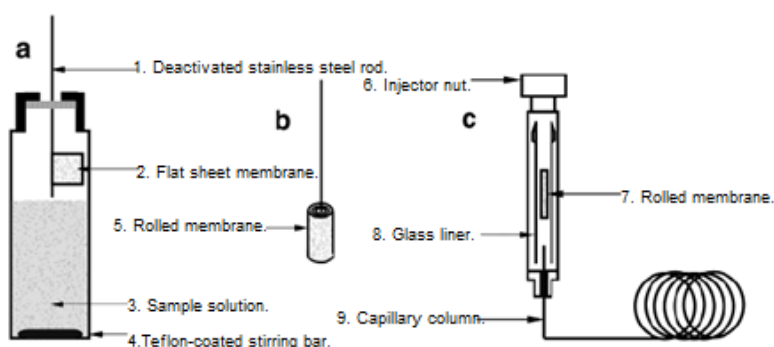
11.2 Επίδραση όγκου φάσης εκχύλισης

Στην περίπτωση όπου ο όγκος του δείγματος είναι πολύ μεγάλος $K_{fs}V_f \ll V_s$ τότε η εξίσωση που εκφράζει την ποσότητα της εκχυλιζόμενης ουσίας είναι:
$$n = K_{fs}V_f C_o \quad (7) \quad (7)$$
 Η ποσότητα της εκχυλιζόμενης ουσίας είναι ανεξάρτητη από τον

όγκο του δείγματος και ανάλογη του όγκου της εκχυλιζόμενης φάσης. Συνεπώς, η ευαισθησία της μεθόδου εκχύλισης θα αυξάνεται με την αύξηση του πάχους του πολυμερούς υλικού που επικαλύπτει την ίνα. Παράλληλα, όμως, η αύξηση του όγκου της εκχυλιζόμενης φάσης οδηγεί σε εκτενέστερο χρόνο εκχύλισης^[6,45].

Η εφαρμογή λεπτής μεμβράνης από PDMS (Thin Film PDMS) ως φάση εκχύλισης δημιουργήθηκε από τον J.Pawliszyn και την ερευνητική του ομάδα και οδήγησε σε αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου και σε μείωση του χρόνου εκχύλισης. Αυτή η μορφή εκχυλιζόμενης φάσης χαρακτηρίζεται από την υψηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο με αποτέλεσμα να επιτυγχάνει αυξημένη εκχυλιζόμενη ποσότητα αναλυτών σε σύντομο χρόνο εκχύλισης^[45].

Ο J.Pawliszyn (2003) σύγκρινε τα αποτελέσματα εκχύλισης μίας σειράς ΠΑΥ διαφορετικής πτητικότητας που λήφθηκαν με την εμπορικά διαθέσιμη ραβδοειδή ίνα PDMS και με τη λεπτή μεμβράνη από PDMS (Thin Film PDMS), οι οποίες εκτέθηκαν απευθείας στο δείγμα και στον υπερκείμενο χώρο. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την θεωρία καθώς με την νέα φάση εκχύλισης επιτεύχθηκε υψηλή ευαισθησία και ταυτόχρονα μικρός χρόνος εκχύλισης. Επιπλέον, με τη λεπτή μεμβράνη εκχυλίζονται αποτελεσματικά και οι ημι-πτητικοί ΠΑΥ. Μοναδικό μειονέκτημα αποτελεί η πολυπλοκότητα της εισαγωγής και της εκρόφησης στο αναλυτικό όργανο που στην προκειμένη περίπτωση ήταν GC/MS^[45].



Εικ. 11.1. Σύστημα SPME υπερκείμενης φάσης με thin-film-fibre^[45].

11.3 Επίδραση όγκου της υπερκείμενης αέριας φάσης

Ο όγκος της υπερκείμενης αέριας φάσης επηρεάζει δραστικά την αποτελεσματικότητα της SPME και πρέπει πάντα να ελέγχεται κατά την βελτιστοποίηση της μεθόδου. Σύμφωνα με την ως τώρα βιβλιογραφία η μείωση του όγκου της υπερκείμενης αέριας φάσης συντομεύει τον χρόνο που απαιτείται για να επέλθει ισορροπία, με αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας και της ακρίβειας της μεθόδου. Αυτό αφορά τις ενώσεις προς ανάλυση που είναι ημιπτητικές, οι οποίες γενικά χαρακτηρίζονται από εκτεταμένους χρόνους αποκατάστασης της ισορροπίας^[6,16,21]. Εάν η ένωση τείνει να συγκεντρώνεται στην υπερκείμενη αέρια, (**large headspace capacity**) δηλ. πτητικές ενώσεις, η εκχύλιση πραγματοποιείται μόνο από την αέρια φάση και η ισορροπία επέρχεται πολύ γρήγορα οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η εκχυλιζόμενη ποσότητα της ένωσης είναι αμελητέα σε σύγκριση με την συγκέντρωσή της στον υπερκείμενο χώρο με αποτέλεσμα να απαιτείται ελάχιστη αναπλήρωση από την υγρή φάση, άρα ο όγκος της υπερκείμενης φάσης δεν επηρεάζει την ευαισθησία της μεθόδου. Στην περίπτωση όπου η ένωση-στόχος τείνει να παρευρίσκεται στην υγρή φάση (**small headspace capacity**) στην αέρια φάση η συγκέντρωσή της είναι μικρή και όταν εισέλθει η ίνα αναταράσσεται και η ισορροπία καθυστερεί να επέλθει με αποτέλεσμα η εκχύλιση να πραγματοποιείται και από την υγρή φάση. Στην δεύτερη περίπτωση το μέγεθος του όγκου της υπερκείμενης φάσης καθορίζει την ευαισθησία της μεθόδου καθώς για μεγάλους όγκους παρατηρείται μείωση της εκχυλιζόμενης ποσότητας.

Στην παρούσα μελέτη η σχέση μεταξύ του μεγέθους του όγκου της υπερκείμενης φάσης με τον χρόνο που απαιτείται για να επέλθει ισορροπία μεταξύ των φάσεων αναιρείται για την εκχύλιση ημιπτητικών αναλυτών. **Η επίδραση του όγκου της υπερκείμενης φάσης στην αποτελεσματικότητα της μεθόδου HSSPME**

είναι αμελητέα λόγω της εφαρμογής συνθηκών κενού στην δειγματοληπτική φιάλη. Στο εσωτερικό της φιάλης επικρατεί πολύ χαμηλότερη πίεση από την ατμοσφαιρική πίεση λόγω της έλλειψης μορίων αέρα γεγονός που διευκολύνει την μεταφορά ενώσεων από την υδάτινη φάση προς την αέρια φάση. Η άρση της επίδρασης του όγκου της υπερκείμενης φάσης αποδεικνύεται από την μορφή των διαγραμμάτων της ποσότητας των ημιπτητικών ΠΑΥ που εκχυλίζονται σε διάφορους χρόνους δειγματοληψίας προς τους χρόνους αυτούς, για δειγματοληπτικές φιάλες διαφορετικού μεγέθους υπό συνθήκες κενού. Επίσης, το φαινόμενο άρσης της επιρροής του υπερκείμενου όγκου είναι εμφανές κατά την σύγκριση διαγραμμάτων που αντιπροσωπεύουν την κλασική μέθοδο μικροεκχύλισης από την υπερκείμενη αέρια φάση (HSSPME) με τα διαγράμματα που εκπροσωπούν την νέα μέθοδο μικροεκχύλισης από την υπερκείμενη αέρια φάση υπό συνθήκες κενού (VAC-HSSPME).

12^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΣΤΑΔΙΟ ΕΚΡΟΦΗΣΗΣ & ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΣΕ ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΟΡΓΑΝΟ

GC/MS

12.1 Εκρόφηση

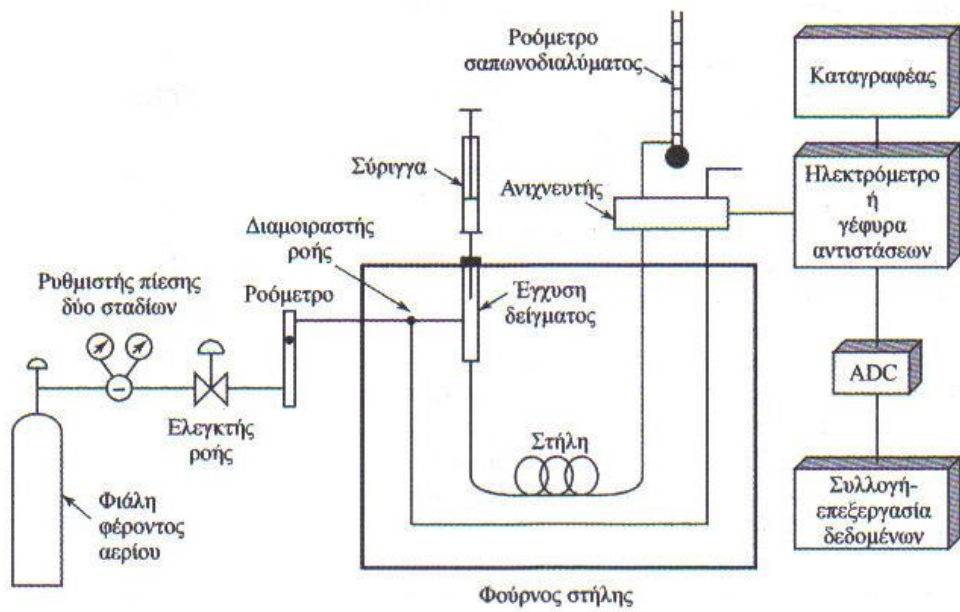
Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αναλυτών, η πολυπλοκότητα των δειγμάτων, η ικανότητα διαχωρισμού και η ευαισθησία οδηγούν στην επιλογή του κατάλληλου αναλυτικού οργάνου για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση μετά την διαδικασία της SPME. Η πιο συνήθης σύζευξη της SPME γίνεται με την αέρια χρωματογραφία (GC) ενώ άρχισε να χρησιμοποιείται η υγρή χρωματογραφία (HPLC) μετά τον σχεδιασμό κατάλληλου συστήματος εισαγωγής^[6,7,16].

Η απόδοση της εκρόφησης με χρήση GC εξαρτάται από την ταχύτητα μεταφοράς των αναλυτών από το υλικό επικάλυψης της ίνας στον εισαγωγέα και από εκεί στη στήλη του GC. Η διαδικασία της εκρόφησης είναι η αντίστροφη της διαδικασίας ρόφησης από μία καλά αναδεδυόμενη υδατική φάση κατά την διαδικασία της SPME. Οι υψηλές γραμμικές ταχύτητες ροής απαιτούνται για την εξασφάλιση της άμεσης απομάκρυνσης των εκροφόμενων ουσιών από την περιοχή γύρω από την ίνα ώστε να μην αλληλεπιδράσουν με το υλικό επικάλυψης και να επιβραδύνουν την διεργασία της εκρόφησης. Αρχικά, οι αναλύτες μεταφέρονται από τα εξωτερικά στρώματα του πολυμερούς υλικού επικάλυψης της ίνας και όσο η διαδικασία προχωράει οι αναλύτες μεταφέρονται από τα πιο εσωτερικά στρώματα μέχρι να ολοκληρωθεί η εκρόφηση των ενώσεων-στόχων^[6,7,16].

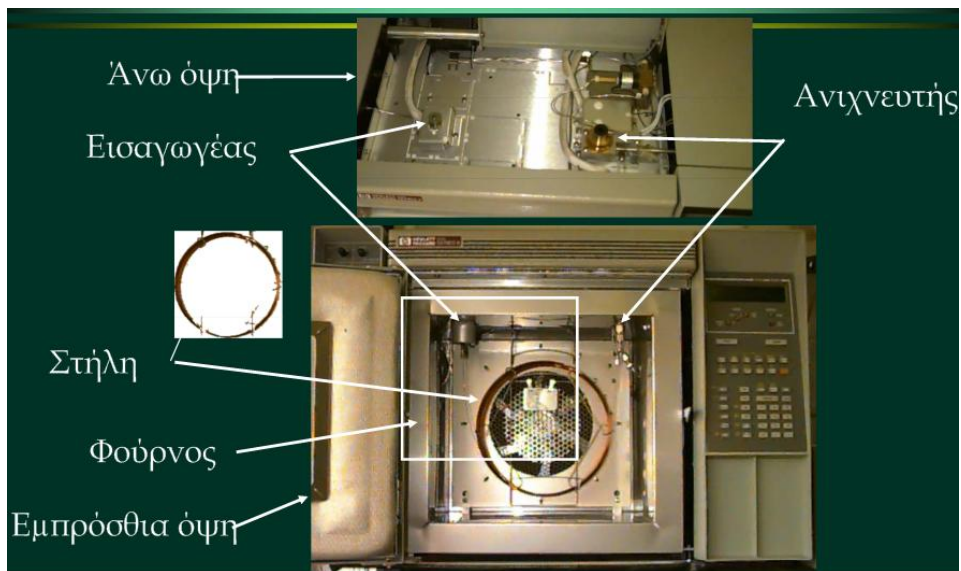
Σύμφωνα με την κινητική θεωρία της εκρόφησης, ο χρόνος εκρόφησης εξαρτάται από την πτητικότητα των αναλυτών, την ροή του φέροντος αερίου, την θερμοκρασία του εισαγωγέα. Οι πτητικότερες ενώσεις εκροφούνται γρηγορότερα από τις λιγότερες

πτητικές. Οι θεωρητικοί χρόνοι εκρόφησης είναι πολύ μικρότεροι από ότι τους πραγματικούς, διότι με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται ο συντελεστής διάχυσης των ουσιών στο υλικό επικάλυψης και μειώνεται η σταθερά κατανομής μεταξύ αερίου και ίνας. Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου SPME για την βελτιστοποίηση των συνθηκών εκρόφησης επιλέγεται ως θερμοκρασία εισαγωγέα η υψηλότερη τιμή του θερμοκρασιακού εύρους λειτουργίας της ίνας το οποίο δίνεται από τον κατασκευαστή. Η υψηλή ροή του φέροντος αερίου μειώνει την απαίτηση για πολύ υψηλή θερμοκρασία του εισαγωγέα καθώς δεν χρειάζεται μια πολύ γρήγορη και εξαντλητική μεταφορά των αναλυτών από την ίνα στον αέριο χρωματογράφο, προστατεύοντας παράλληλα την ίνα από πιθανή φθορά^[6,7,16].

Η χρήση πολύ υψηλών θερμοκρασιών εκρόφησης μειώνει το χρόνο ζωής της ίνας και μπορεί να οδηγήσει σε διαρροή (bleeding) του πολυμερούς υλικού με αποτέλεσμα να δυσκολεύει ο διαχωρισμός και η ποσοτικοποίηση. Σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες το πρόβλημα εντοπίζεται στην μη ολοκληρωμένη εκρόφηση των ενώσεων-στόχων. Αυτό οδηγεί στο φαινόμενο “carryover”, δηλαδή παρατηρείται μία αύξηση στη απόκριση του οργάνου καθώς η ίνα κάθε φορά διαθέτει μια επιπλέον ποσότητα αναλυτών από την προηγούμενη μέτρηση. Αυτό το φαινόμενο πρέπει να ελαχιστοποιείται ή να εξαλείφεται κατά την βελτιστοποίηση της μεθόδου^[6,7,16].



Εικ. 12.1. Σύστημα εισαγωγής SPME fibre σε GC/MS.



Εικ. 12.2. Οργανολογία GC/MS.

13^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

13.1 Αντιδραστήρια

- Fluoranthene (>98% from Sigma Aldrich)
- Naphthalene (>98% from Sigma Aldrich)
- Fluorene (>98% from Sigma Aldrich)
- Acetonitrile (pesticide-grade, Merck KGaA) με βαθμό καθαρότητας Υγρής Χρωματογραφίας
- Υπερκάθαρο (δισ απαιονισμένο) νερό από σύστημα καθαρισμού ύδατος EASYpureRF, από την Barnstead/Thermolyne

Τα πρότυπα διαλύματα εργασίας ετοιμάζονταν καθημερινά στα επιθυμητά επίπεδα συγκεντρώσεων σε υπερκάθαρο νερό.

13.2 Όργανα – Συσκευές

1. Γυάλινες δειγματοληπτικές συσκευές των 500ml και 1000ml (gas sampling bulbs) με στρόφιγγα στην μία πλευρά και τρύπα στην κορυφή (home-made) που σφραγίζεται με πράσινο septa (Thermogreen LB-1 septa half hole type, Supelco, Bellefonte, PA)
2. *Αντλία κενού* (Vacuubrand GmbH & Co. KG, Model MZ 2c NT, Wertheim, Germany)
3. *SPME holder* (Supelco, Bellefonte, PA) 100 μm
4. *PDMS fiber* (Supelco, Bellefonte, PA)
5. *Μαγνητικός αναδευτήρας* (Sigma-Aldrich) επικαλυμμένος με Teflon (10 mm×5 mm)

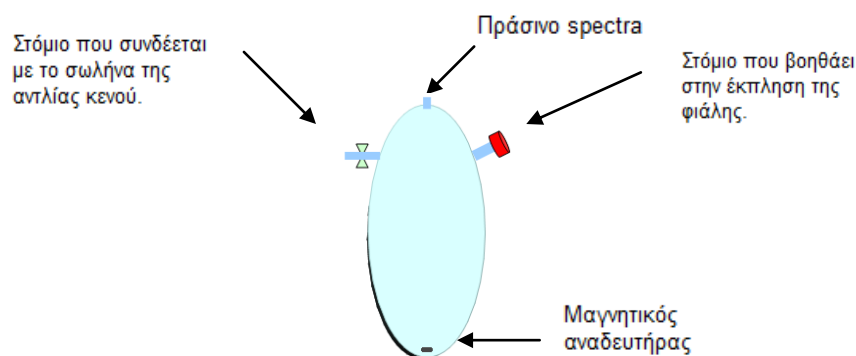
6. Σύριγγα κενού 10ml (gas tight SGE, Australia)
7. Συσκευή ανάδευσης (Heidolph, MR 3001 K, Germany)
8. Hamilton HPLC μικροσύριγγα των 10 μ L, μοντέλο 1701 N
9. Incubator ρυθμισμένο στον 25 °C (Elvem, Athens, Greece)
10. Septa F.Merlin Mroseal στον εισαγωγέα του GC/MS (Merlin Instrument Company)
11. He (>99.999%pure) ως φέρον αέριο για το GC με ρυθμό 1,2ml/min
12. GC: GC-17 A; MS: GCMS-QP5050 A (Shimadzu, Kyoto - Japan); Column: J&W Scientific (30 m x 0.25 mm i.d.) DB-5, 5% diphenylpolydimethylsiloxane (film thickness 0.25 mm)

13.3 Πειραματική διαδικασία

✓ Headspace Solid Phase Microextraction under Vacuum conditions (vac-HSSPME)

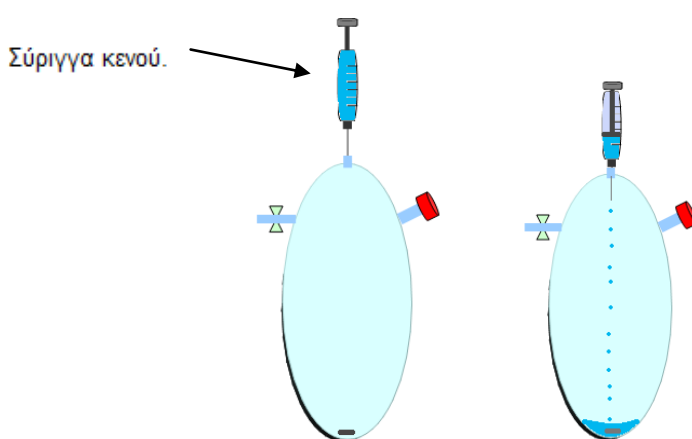
1^ο βήμα: Παρασκευή πρότυπου διαλύματος εργασίας: 10ppb μίγμα των 3 ΠΑΥ σε υπερκάθαρο νερό.

2^ο βήμα: Εφαρμόζουμε συνθήκες κενού στην δειγματοληπτική φιάλη η οποία περιέχει ένα μαγνητικό αναδευτήρα με την βοήθεια της αντλίας κενού.



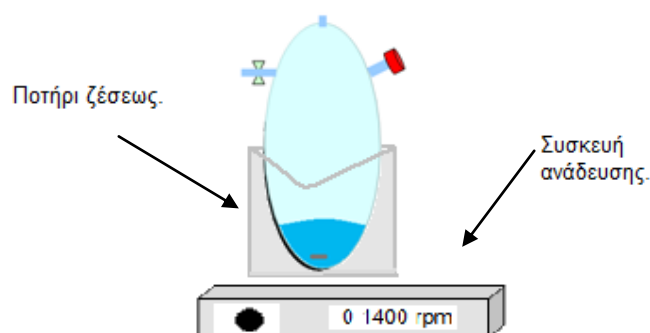
Εικ 13.1. Αναπαράσταση 2^{ου} βήματος.

3^ο βήμα: Με την βοήθεια μίας σύριγγας κενού εισάγονται 10ml πρότυπου διαλύματος στην κενή δειγματοληπτική φιάλη η οποία στερεώνεται σε ποτήρι ζέσεως. Μόλις η ένεση της σύριγγας κενού διαπερνά το προτρυπημένο πράσινο septa που βρίσκεται στην κορυφή της φιάλης, το διάλυμα αυτόματα αρχίζει και ρέει στο εσωτερικό της φιάλης, το έμβολο της σύριγγας κατεβαίνει χωρίς την βοήθεια του χειριστή. Αυτό συμβαίνει λόγω της έλλειψης αέρα στο εσωτερικό της σύριγγας. Εφόσον εισαχθεί όλη η ποσότητα στην φιάλη, η σύριγγα αποτραβιέται.



Εικ 13.2. Αναπαράσταση 3^{ου} βήματος.

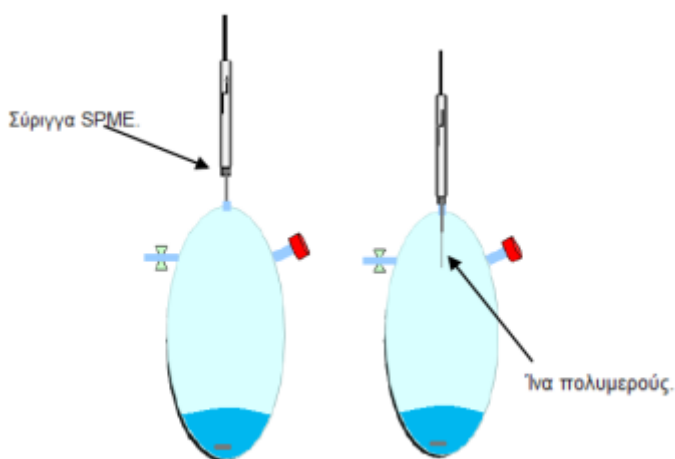
4^ο βήμα: Η κενή δειγματοληπτική φιάλη με το διάλυμα τοποθετείται πάνω σε αναδευτήρα μέσα στον επωαστή (incubator) που είναι ρυθμισμένο στους 25 °C ώστε η θερμοκρασία του περιβάλλοντος να παραμένει σταθερή κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για καθορισμένο χρονικό διάστημα ώστε να επέλθει ισορροπία μεταξύ υγρής μήτρας και υπερκείμενης φάσης.



Εικ 13.3. Αναπαράσταση 4^{ου} βήματος.

5^ο βήμα: Η ένεση της SPME διαπερνά το προτρυπημένο πράσινο septa που βρίσκεται στην κορυφή της φιάλης, και το έμβολο πιέζεται προς τα κάτω ώστε η ίνα από πολυμερές να εμφανιστεί και να ξεκινήσει η διαδικασία της εκχύλισης.

Κάθε μέρα, πριν από την πρώτη χρήση πραγματοποιείται λευκή ανάλυση (blank run) για να διαπιστωθεί η απουσία ακαθαρσιών και υπολειμμάτων ΠΑΥ στην ίνα. Κατά την εκχύλιση η συσκευή SPME στερεώνεται με στάτορα και η δειγματοληπτική φιάλη σταθεροποιείται με ένα ποτήρι ζέσεως. Η ίνα εκτίθεται στην υπερκείμενη φάση για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα το οποίο ονομάζεται «χρόνος εκχύλισης» ώστε να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση των ΠΑΥ.



Εικ 13.4. Αναπαράσταση 5^{ου} βήματος.

6^ο βήμα: Μόλις ολοκληρωθεί η εκχύλιση η ίνα πολυμερούς αποσύρεται και η σύριγγα SPME αποτραβιέται και μεταφέρεται στο σύστημα εισαγωγής του δείγματος του GC-MS για εκρόφιση όπου παραμένει για 5min για να παρασυρθούν από το φέρον αέριο οι ΠΑΥ ενώσεις. Με την βοήθεια του GC/MS πραγματοποιείται ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των ενώσεων στόχων.

✓ **Headspace Solid Phase Microextraction under atmospheric pressure (HSSPME)**

Ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία με την vac-HSSPME μόνο που παραλείπεται το 2^ο βήμα και στο 3^ο βήμα το διάλυμα δεν ρέει αυτόματα λόγω της ύπαρξης μορίων αέρα στο εσωτερικό της μεμβράνης. Επομένως, ο χειριστής πρέπει να πιέσει το έμβολο της σύριγγας ώστε να μεταφερθεί το διάλυμα από την σύριγγα στη φιάλη.

13.4 Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού των ΠΑΥ με χρήση GC/MS.

Ο προσδιορισμός των PAHs έγινε με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματογράφο μάζας (GC-MS), με εισαγωγή δείγματος με ή χωρίς διαχωρισμό ροής (split/splitless). Το φέρον αέριο από τη φιάλη υψηλής πίεσης, μέσα από ρυθμιστές παροχής, οδηγείται στον εισαγωγέα και στη συνέχεια στη στήλη. Ακολουθώντας τη μέθοδο έγχυσης splitless, η οποία προτιμάται για τα αραιά δείγματα, όλο το δείγμα που εισάγεται στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου εξατμίζεται και συμπυκνώνεται στις πρώτες στροφές της τριχοειδούς στήλης. Παρασυρόμενο από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των προς ανάλυση ουσιών. Τα κλάσματα ανιχνεύονται στη συνέχεια από τον ανιχνευτή και τα σήματα της ανίχνευσης καταγράφονται και οδηγούνται σε μικροϋπολογιστή.

Επομένως, για τον διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση των αναλυτών ΠΑΥ, χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος με ανιχνευτή φασματογράφο μάζας (GC/MS). Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με μέθοδο έγχυσης splitless, η θερμοκρασία του εισαγωγέα είναι ρυθμισμένος στους 260 °C και η ροή σταματά μετά από 5min. Το φέρον αέριο είναι ήλιο (He) καθαρότητας 99,99995%, με ταχύτητα ροής 1,2 mL min⁻¹. Ο φούρνος της στήλης αρχικά βρισκόταν στους 50°C για 5 min

και έπειτα αυξήθηκε στους 160 °C με ρυθμό 10 °C min⁻¹, και τέλος έφτασε τους 270 °C με ρυθμό 5 °C min⁻¹ όπου κρατήθηκε για 2 min. Ο ανιχνευτής του φασματογράφου μάζας και η θερμοκρασία στην διεπιφάνεια του εισαγωγέα του GC είναι ρυθμισμένα στους 320 °C. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν διάρκειας 42 λεπτών. Ο ιονισμός του δείγματος γίνεται με σύγκρουση με δέσμη ηλεκτρονίων και ρυθμίζεται έλεγχος επιλεγμένων ιόντων ως εργαλείο ποσοτικής ανάλυσης (Single ion monitoring, SIM). Η ποσοτικοποίηση βασίζεται στο σχηματισμό των ιοντικών θραυσμάτων ($m/z=50-350$) που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 13.1 μαζί με το χρόνο ανάσχεσης του κάθε αναλύτη από το GC.

Πίνακας 13.1

Ενώσεις-στόχοι	t_r (min)	Mr
Naphthalene	13,6	128
Fluorene	20,9	166
Fluoranthene	30,9	202



Εικ. 13.5. Φωτογραφία της πειραματικής διάταξης.



Εικ. 13.6. Φωτογραφία του αναλυτικού οργάνου GC/MS.

14^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

14.1 Επίδραση της σταθεράς Henry (K_H) στην διεξαγωγή της εκχύλισης HSSPME.

✓ **Ναφθαλένιο**

Η οργανική ένωση του ναφθαλενίου χαρακτηρίζεται από ενδιάμεση τιμή K_H ($4,4 \cdot 10^{-4} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$) με αποτέλεσμα η ταχύτητα εξάτμισής της να εξαρτάται από συνδυασμό της αντίστασης της μεταφοράς μάζας που επέρχεται από την αέρια και την υγρή φάση. Στην πραγματικότητα η αντίσταση στην υγρή φάση είναι αυτή που κυριαρχεί και καθορίζει την ταχύτητα εξάτμισης. Αυτό αποδεικνύεται στο διάγραμμα 14.4.1 στο οποίο φαίνεται ότι μέσα σε 20min επιτυγχάνεται η ισορροπία στο σύστημα της HSSPME υπό συνθήκες μειωμένης και ατμοσφαιρικής πίεσης. Αυτό συμβαίνει γιατί όταν η αντίσταση στη μεταφορά μάζας προέρχεται από την υγρή φάση η ταχύτητα της εξάτμισης δεν εξαρτάται από την ολική πίεση του συστήματος.

Η ποσότητα του ναφθαλενίου που εκχυλίζεται από την ίνα πριν επέλθει θερμοδυναμική ισορροπία παραμένει ίδια όταν εφαρμόζεται η VAC-HSSPME και η HSSPME καθώς η εκχυλιζόμενη ποσότητα σε αυτήν την περίπτωση δεν εξαρτάται από την ολική πίεση του συστήματος καθώς η σταθερά Henry όταν κυμαίνεται σε ενδιάμεσες προς υψηλές τιμές επηρεάζεται μόνο από υψηλές λειτουργικές πιέσεις.

✓ **Φλουορένιο**

Η ένωση-στόχος φλουορένιο διαθέτει τιμή K_H ίση με $9,62 \cdot 10^{-5} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ η οποία κυμαίνεται στην οριογραμμή των ενδιάμεσων και των χαμηλών σταθερών Henry. Σύμφωνα με το διάγραμμα 14.4.2 παρατηρείται ότι η ταχύτητα εξάτμισης της ένωσης εξαρτάται από την αντίσταση στη μεταφορά μάζας που προέρχεται από την αέρια φάση και η K_H επηρεάζεται από την ολική πίεση του συστήματος. Επομένως

με διεξαγωγή της HSSPME υπό συνθήκες μειωμένης πίεσης επιταχύνεται η κινητική της διαδικασίας καθώς η ισορροπία επέρχεται μέσα σε 20min σε αντίθεση με την HSSPME υπό ατμοσφαιρική πίεση που επέρχεται μετά από 90 min.

Βάση της θεωρίας για ενώσεις-στόχους παρόμοιες με το φλουορένιο η αναλογία των εκχυλιζόμενων μαζών VAC-HSSPME/HSSPME όταν έχει επέλθει θερμοδυναμική ισορροπία ισούται με την μονάδα. Αυτό συμβαίνει γιατί η συνολική ποσότητα που εκχυλίζεται από την ίνα όταν το σύστημα έχει επέλθει σε ισορροπία είναι ίδια ανεξάρτητα από τις συνθήκες πίεσης που επικρατούν κατά την εκχύλιση. Συγκεκριμένα στο διάγραμμα 14.4.2 παρατηρείται ότι υπό συνθήκες κενού η ποσότητα του φλουορενίου που εκχυλίζετε στα 20min είναι η τριπλάσια σε σύγκριση με την εκχυλιζόμενη ποσότητα την ίδια χρονική περίοδο υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Αυτή η διαφορά εξαλείφεται όταν το σύστημα HSSPME υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης φτάσει σε ισορροπία δηλαδή μετά από 90min η καμπύλη εκχύλισης που λήφθηκε με την εφαρμογή της VAC-HSSPME και εκείνη της HSSPME συμπίπτουν.

✓ **Φλουρανθένιο**

Το φρουρανθένιο είναι ο ΠΑΥ με το χαμηλότερο K_H ($8,86 \cdot 10^{-6} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$) που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη. Παράλληλα χαρακτηρίζεται από υψηλό K_{ow} καθορίζοντάς την ως μία ημιπηκτική υδρόφοβη ένωση-στόχο. Όπως ήταν αναμενόμενο βάσει της θεωρίας παρατηρούνται εκτενείς χρόνοι εκχύλισης κατά την εκχύλιση της με HSSPME. Συγκεκριμένα δεν επιτυγχάνεται η ισορροπία ούτε με την εφαρμογή συνθηκών μειωμένης πίεσης ούτε φυσικά με την υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης ακόμη και μετά από 90min δειγματοληψίας.

Η ταχύτητα εξάτμισης της ένωσης του φλουρανθενίου που διαθέτει χαμηλό K_H εξαρτάται από την αντίσταση μεταφοράς της μάζας στην αέρια φάση και γι 'αυτό

η κινητική του συστήματος εκχύλισης HSSPME υπό συνθήκες μειωμένης πίεσης επιταχύνεται και η εκχυλιζόμενη ποσότητα ενισχύεται πριν επέλθει ισορροπία.

Συμπεράσματα

- ✓ Ενώσεις με χαμηλό ή με ενδιάμεσο προς χαμηλό K_H η ταχύτητα εξάτμισής τους εξαρτάται από την αντίσταση μεταφοράς μάζας στην αέρια φάση η οποία επηρεάζεται από την ολική πίεση που επικρατεί στο σύστημα με αποτέλεσμα το σύστημα της HSSPME υπό συνθήκες μειωμένης πίεσης να επέρχεται σε ισορροπία σε συντομότερο χρονικό διάστημα. Επίσης, ενισχύεται η ποσότητα που εκχυλίζεται από την ίνα όμως εάν επέλθει η ισορροπία η αναλογία της εκχυλιζόμενης μάζας υπό συνθήκες κενού/υπό κανονικές συνθήκες πίεσης ισούται με την μονάδα.
- ✓ Ενώσεις με ενδιάμεσο K_H δεν βελτιώνεται η ταχύτητα εξάτμισής τους καθώς η αντίσταση μεταφοράς μάζας προέρχεται από την υγρή φάση και δεν εξαρτάται από την ολική πίεση που επικρατεί στο σύστημα.

14.2 Επίδραση όγκου υπερκείμενης φάσης υπό συνθήκες μειωμένης πίεσης.

Ο όγκος της υγρής μήτρας παρέμεινε σταθερός και ίσος με 10ml ενώ χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικού μεγέθους δειγματοληπτικές φιάλες, μία των 500ml και μία των 1000ml. Συνεπώς, η δειγματοληπτική φιάλη των 1000ml (υπερκείμενος όγκος 990ml) διαθέτει τον διπλάσιο υπερκείμενο αέριο όγκο από εκείνη των 500ml (υπερκείμενος όγκος 490ml). Πρέπει να σημειωθεί ότι τα διαγράμματα της ποσότητας ενώσεων-στόχων που εκχυλίζονται από την στατική-

στερεή φάση προς το χρόνο εκχύλισης εμφανίζουν το ίδιο μοτίβο στην περίπτωση των πτητικών ΠΑΥ και το ίδιο στη περίπτωση των ημιπτητικών ΠΑΥ κατά την νέα μέθοδο VAC-HSSPME και κατά την μέθοδο HSSPME υπό ατμοσφαιρική πίεση.

✓ **Ναφθαλένιο**

Ως πτητική ένωση, η ποσότητα του ναφθαλενίου που εκχυλίζεται σύμφωνα με την θεωρία και το διάγραμμα 14.4.1 δεν εξαρτάται από τον υπερκείμενο όγκο και δεν επηρεάζεται από την ολική πίεση του συστήματος HSSPME. Στο διάγραμμα 14.4.1 οι καμπύλες εκχύλισης που λήφθηκαν υπό συνθήκες μειωμένης και ατμοσφαιρικής πίεσης με την δειγματοληπτική φιάλη των 500ml συμπίπτουν. Παρατηρείται μία μείωση στην ταχύτητα της εκχύλισης της μεθόδου με την χρήση της δειγματοληπτικής φιάλης των 1000ml η οποία οφείλεται στην μειωμένη απόδοση της ανάδευσης και όχι στην μεταβολή του υπερκείμενου όγκου.

✓ **Φλουορένιο**

Το κοινό προφίλ των καμπυλών εκχύλισης (διάγραμμα 14.4.2) του φλουορενίου που λήφθησαν με τη VAC-HSPME όταν χρησιμοποιήθηκε η δειγματοληπτική φιάλη των 500ml και η δειγματοληπτική φιάλη των 1000ml οφείλεται στο γεγονός ότι είναι ημιπτητική ένωση. Αυτό σημαίνει ότι οι συνθήκες μειωμένης πίεσης επιταχύνουν την κινητική του δυναμικού συστήματος αυξάνοντας την ταχύτητα εξάτμισης της ένωσης με αποτέλεσμα η αποκατάσταση του ποσού του αναλύτη που ροφάται από την ίνα να γίνεται απευθείας. Αυτό συμβάλει στην ενίσχυση της εκχυλιζόμενης ποσότητας και στην άρση της επίδρασης του όγκου υπερκείμενης φάσης στην ευαισθησία της μεθόδου.

Οι καμπύλες που λήφθηκαν (διάγραμμα 14.4.2) κατά την εκχύλιση του φλουορενίου με την μέθοδο HSSPME υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης με τις δύο διαφορετικού μεγέθους δειγματοληπτικές φιάλες διαφέρουν μεταξύ τους. Η ποσότητα

που ροφάται πάνω στο πολυμερές υλικό της ίνας κατά την εκχύλιση στην οποία χρησιμοποιήθηκε η 500ml δειγματοληπτική φιάλη υπό ατμοσφαιρική πίεση είναι μεγαλύτερη από τη ποσότητα που εκχυλίστηκε όταν χρησιμοποιήθηκε η φιάλη των 1000ml, επίσης υπό ατμοσφαιρική πίεση. Επομένως, το μέγεθος του υπερκείμενου χώρου παίζει σημαντικό ρόλο στην ποσότητα που θα εκχυλιστεί από τη φάση εκχύλισης όταν οι ενώσεις στόχοι είναι ημιπτητικές και στο σύστημα έχει επέλθει από ισορροπία. Σε αυτή τη περίπτωση η αύξηση του όγκου της υπερκείμενης φάσης οδηγεί σε αύξηση των χρόνων αποκατάστασης της ισορροπίας. Επομένως, η εφαρμογή μικρότερου υπερκείμενου βελτιστοποιεί τη μέθοδο HSSPME υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης όταν οι αναλύτες είναι ημι-πτητικές ενώσεις.

✓ **Φλουορανθένιο**

Οι καμπύλες (διάγραμμα 14.4.3) εκχυλιζόμενης ποσότητας προς το χρόνο εκχύλισης που λήφθηκαν κατά την εκχύλιση υπό συνθήκες κενού της ημι-πτητικής ένωσης φλουορανθένιο με την δειγματοληπτική φιάλη των 500ml συμπίπτουν με εκείνες της φιάλης των 1000ml η οποία διαθέτει τον διπλάσιο υπερκείμενο όγκο, επιβεβαιώνοντας την θεωρία ότι η μείωση της πίεσης οδηγεί στην άρση της επίδρασης του μεγέθους του υπερκείμενου χώρου. Σε αντίθεση, οι καμπύλες που λήφθηκαν κατά την εκχύλιση υπό ατμοσφαιρική πίεση για τους αναφερόμενους ημιπτητικούς ΠΑΥ διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους. Η ποσότητα των ενώσεων που ροφήθηκε από την ίνα του πολυμερούς κατά την χρήση της δειγματοληπτικής φιάλης των 500ml είναι μεγαλύτερη από την εκχυλιζόμενη ποσότητα όταν χρησιμοποιούταν η δειγματοληπτική φιάλη των 1000ml για όλους του χρόνους εκχύλισης. Το τελευταίο επιβεβαιώνει την θεωρία του J.Pawlisyn κατά τον οποίο η μείωση του υπερκείμενου όγκου μειώνει τον χρόνο αποκατάστασης της θερμοδυναμικής

ισορροπίας και αυξάνει την εκχυλιζόμενη ποσότητα πριν επέλθει ισορροπία στο σύστημα.

Συμπεράσματα

- ✓ Η επίδραση του όγκου υπερκείμενης φάσης για πτητικές ενώσεις υπό συνθήκες κενού δεν υφίσταται.
- ✓ Η ευαισθησία της μεθόδου HSSPME όταν οι αναλύτες είναι ημιπτητικές ενώσεις επηρεάζεται από τον υπερκείμενο όγκο. Συγκεκριμένα, η μείωση του υπερκείμενου όγκου επιταχύνει την αποκατάσταση της ισορροπίας (ταχύτερη αναπλήρωση της ποσότητας που ροφάται) και βελτιστοποιεί την μέθοδο. Η επίδραση του όγκου της υπερκείμενης φάσης στην ευαισθησία της μεθόδου άρεται όταν εφαρμοστούν συνθήκες μειωμένης πίεσης.

14.3 Επίδραση ανάδευσης στην Vac-HSSPME

Η σειρά πειραμάτων εκχύλισης με την μέθοδο HSSPME που μελετά την επίδραση της ανάδευσης στην αποτελεσματικότητα της τεχνικής επιβεβαιώνει την θεωρία που αναφέρεται στο 9^ο κεφάλαιο.

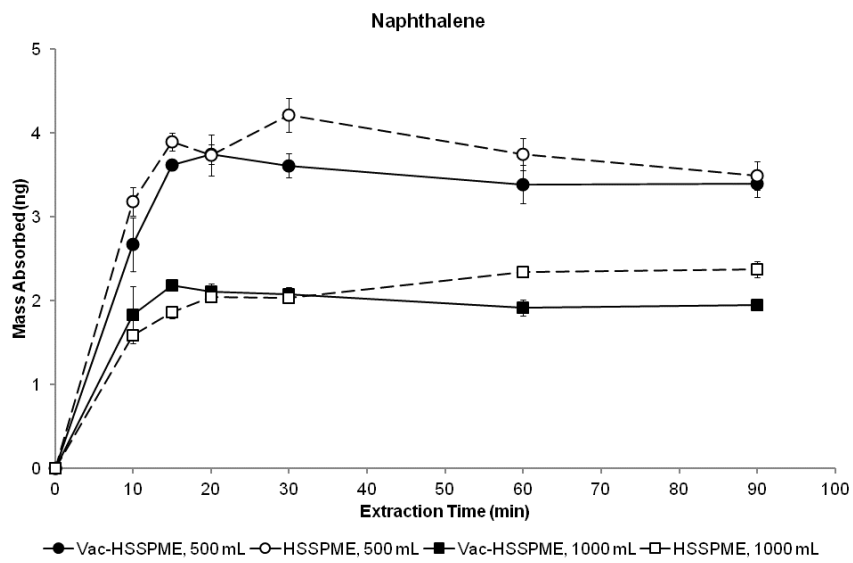
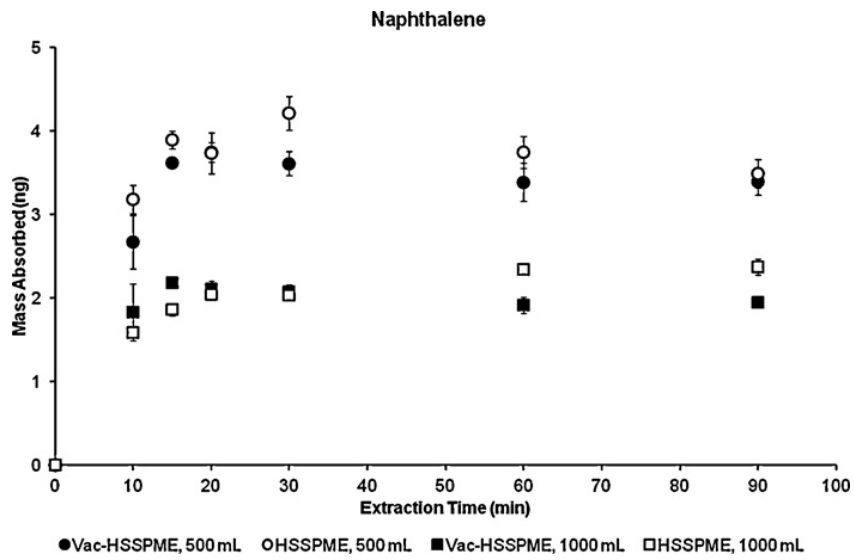
Η εφαρμογή ανάδευσης κατά την εκχύλιση με HSSPME των αναλυτών ναφθαλενίου και φλουορενίου ενισχύει την ποσότητα που εκχυλίζεται από την ίνα υπό συνθήκες μειωμένης και ατμοσφαιρικής πίεσης.

Η θετική επίδραση της ανάδευσης στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης του φλουρανθενίου είναι εμφανής μόνο όταν εφαρμόζεται HSSPME υπό συνθήκες κενού καθώς υπό κανονικές συνθήκες πίεσης η αντίσταση στην μεταφορά μάζας από το δείγμα στον υπερκείμενο όγκο κυριαρχεί. Αυτό δεν επιτρέπει την μετανάστευση

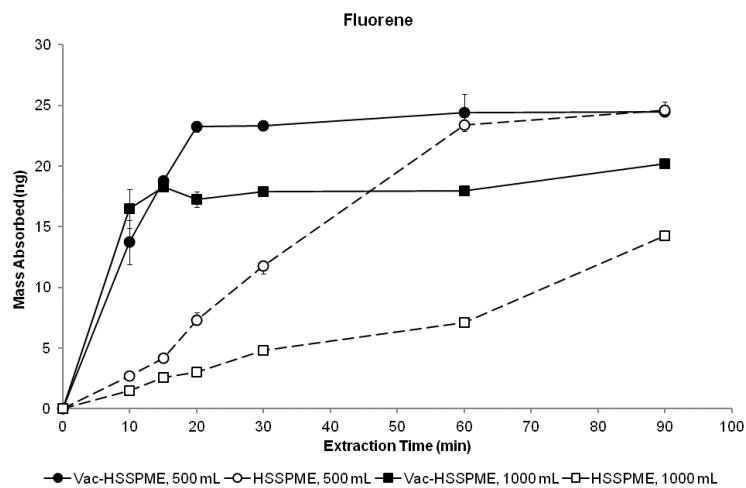
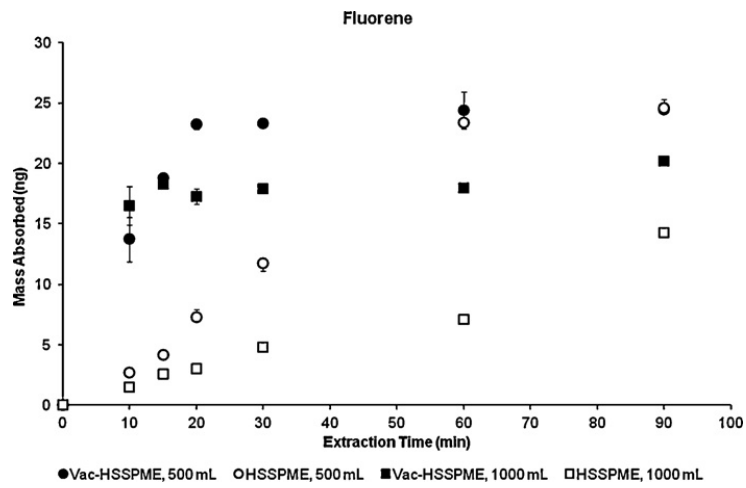
την ένωσης στον υπερκείμενο χώρο με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύονται ικανοποιητικές ποσότητες πάνω στην ίνα ούτε όταν το δείγμα αναδεύεται στα 1000rpm ούτε φυσικά με την έλλειψη ανάδευσης.

14.4 Διαγράμματα εκχυλιζόμενης ποσότητας αναλυτών προς το χρόνο εκχύλισης.

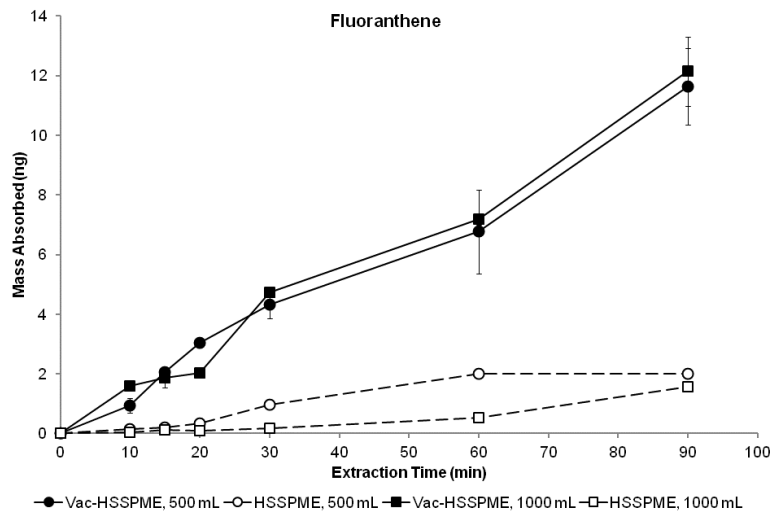
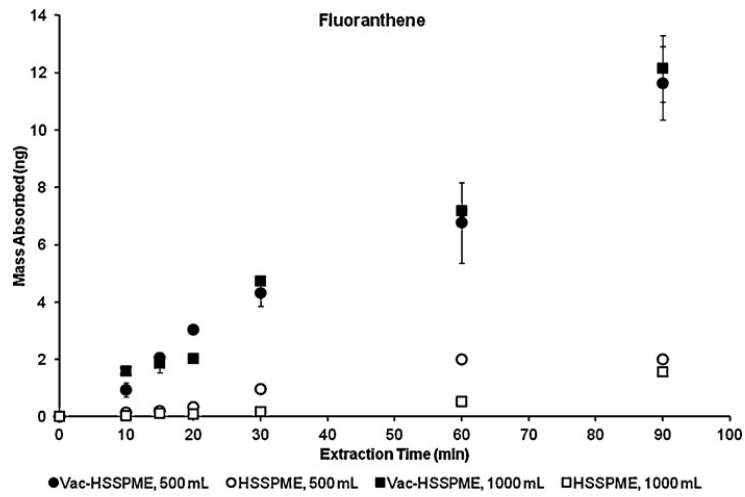
❖ Συνθήκες που επικρατούν στην εκχύλιση των διαγραμμάτων 14.4.1, 14.4.2 & 14.4.3: 10ml δείγμα από 10ppb mix των 3 PAH (naphthalene, fluorene, flouoranthene) σε υπερκάθαρο νερό, δειγματοληπτική φιάλη των 500ml και των 1000ml, 10 min προ-ισορροπία με 1000rpm ανάδευση, από 10min ως και 90min δειγματοληψία με 1000rpm ανάδευση, συνθήκες μειωμένης και ατμοσφαιρικής πίεσης, σταθερή θερμοκρασία στους 25 °C, pH 6, 0%NaCl, PDMS red 100μm και ρύθμιση σε βάθος 3.4 cm.



Διάγραμμα 14.4.1. Διάγραμματα εκχυλιζόμενης ποσότητας ναφθαλενίου (naphthalene) προς το χρόνο εκχύλισης.



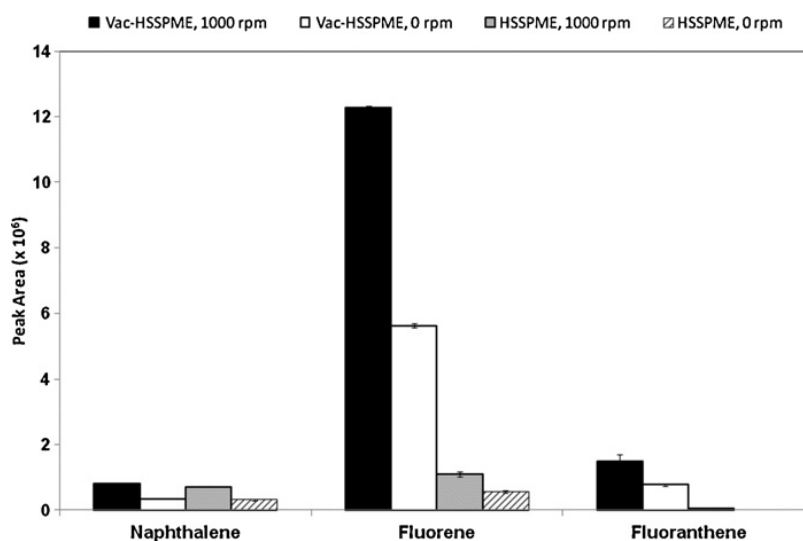
Διάγραμμα 14.4.2. Διάγραμμα εκχυλιζόμενης ποσότητας φλουορενίου (fluorene) προς το χρόνο εκχύλισης.



Διάγραμμα 14.4.3. Διάγραμμα εκχυλιζόμενης ποσότητας φλουορανθένιο (fluoranthene) προς το χρόνο εκχύλισης.

14.5 Διαγράμματα εκχυλιζόμενης ποσότητας αναλυτών προς το είδος του αναλύτη.

❖ Συνθήκες που επικρατούν στην εκχύλιση του διαγράμματος 14.5.1 δείγμα 10ppb 3 PAH (naphthalene, fluorene, flouoranthene) σε υπερκάθαρο νερό, δειγματοληπτική φιάλη των 500ml, 10 min προ-ισορροπία με 1000rpm ή 0 rpm ανάδευση, 30min δειγματοληψία με ή 0 rpm ανάδευση, συνθήκες μειωμένης και ατμοσφαιρικής πίεσης, σταθερή θερμοκρασία στους 25 °C, pH 6, 0%NaCl, PDMS red 100μm και ρύθμιση σε βάθος 3.4 cm.



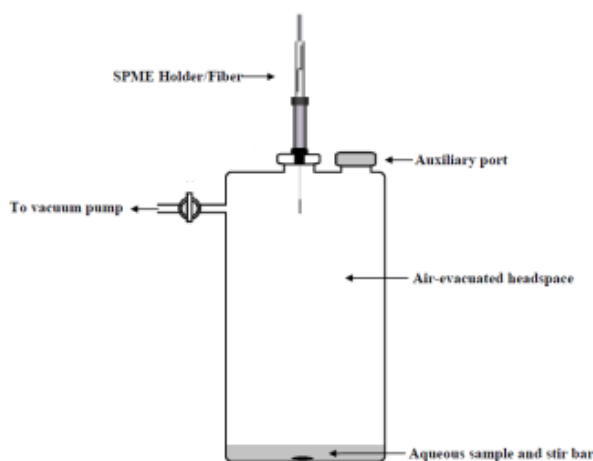
Διάγραμμα 14.5.1. Διάγραμμα εκχυλιζόμενης ποσότητας αναλυτών.

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Ο συντελεστής Henry είναι το φυσικοχημικό χαρακτηριστικό που προβλέπει την συμπεριφορά ενός αναλύτη σε ένα σύστημα HSSPME καθώς επιδεικνύει από πού προέρχεται η αντίσταση στο καθοριστικό στάδιο της εξάτμισης. Η παρούσα μελέτη αποδεικνύει ότι οι αναλύτες με ενδιαμέση προς χαμηλή και με χαμηλή τιμή K_H των οποίων η ταχύτητα εξάτμισης εξαρτάται από την αντίσταση στην μεταφορά της μάζας που προέρχεται από την αέρια φάση (διεπιφάνεια υγρής/αέριας φάσης) η εφαρμογή συνθηκών μειωμένης πίεσης με HSSPME πριν επέλθει σε ισορροπία το σύστημα ενισχύει την ευαισθησία της μεθόδου σε σύγκριση με την HSSPME υπό κανονικές συνθήκες πίεσης και επιταχύνει την επίτευξη ισορροπίας στο σύστημα. Σε αυτή την περίπτωση αναλυτών ενισχύεται η κινητική της εκχύλισης με την εφαρμογή συνθηκών κενού και η αναπλήρωση της ποσότητας του αναλύτη που ροφάται από την ίνα γίνεται άμεσα. Με αποτέλεσμα η άρση της επίδρασης του υπερκείμενου όγκου στην ευαισθησία της μεθόδου εκχύλισης σε αντίθεση με την κλασική HSSPME όπου η αύξηση του υπερκείμενου όγκου μειώνει την ευαισθησία της μεθόδου και αυξάνει τον χρόνο εκχύλισης. Η ταχύτητα εξάτμισης των αναλυτών με ενδιαμέση τιμή K_H εξαρτάται κυρίως από την αντίσταση στην μεταφορά της μάζας που προέρχεται από την υγρή φάση και η εφαρμογή συνθηκών μειωμένης πίεσης κατά την εκχύλιση με HSSPME δεν επιταχύνει τους χρόνους εκχύλισης ούτε αυξάνει την ποσότητα που εκχυλίζεται από την ίνα πριν επέλθει θερμοδυναμική ισορροπία. Παράλληλα επειδή αυτού του είδους οι αναλύτες έχουν την τάση να συγκεντρώνονται στον υπερκείμενο χώρο και η αναπλήρωση της ποσότητας που ροφάται από την ίνα γίνεται άμεσα ανεξάρτητα από την ολική πίεση του συστήματος, ο όγκος της υπερκείμενης φάσης δεν επιδρά στους χρόνους εκχύλισης και στην ευαισθησία της μεθόδου εκχύλισης HSSPME υπό συνθήκες μειωμένης και

ατμοσφαιρικής πίεσης. Τέλος, η παρούσα μελέτη αποδεικνύει ότι η εφαρμογή ανάδευσης κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας βελτιώνει την απόδοση της VAC-HSSPME. Στην **εικόνα 15.1** φαίνεται η πειραματική διάταξη της μεθόδου VAC-HSSPME που μελετήθηκε.

Μελλοντικές Κατευθύνσεις: Η μέθοδος μικροεκχύλισης nonequilibrium Vac-HSSPME αποτελεί μία ενδιαφέρουσα πρόταση ιδιαίτερα στα πλαίσια της αναλυτικής χημείας στο τομέα προετοιμασία δείγματος. Αυτό οφείλετε στην υψηλή ταχύτητα και ευαισθησία της μεθόδου για αναλύτες που χαρακτηρίζονται από χαμηλή τιμή σταθεράς Henry. Παρόλα αυτά η νέα τεχνική μικροεκχύλισης απαιτεί βελτιστοποίηση γιατί δυσχεραίνεται η χρήση της σε περίπτωση που υπάρχει μεγάλος όγκος δειγμάτων που θα πρέπει να αναλυθούν σε σύντομο χρονικό διάστημα. Προτείνεται η μελέτη αυτοματοποίησης της μεθόδου η οποία αποτελεί αντικείμενο έρευνας του εργαστηρίου στη παρούσα φάση.



Εικ. 15.1. Απεικόνιση της πειραματικής διάταξης VAC-HSSPME.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Θ. Π. Χατζηϊωάννου, Μ. Α. Κούπαρη, (Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών, 2000), '*Ενόργανη Ανάλυση*', σελ. 377-388
2. Skoog, Holler, Nieman, (Εκδόσεις Κωσταράκης, 2002), '*Αρχές της ενόργανης ανάλυσης*', σελ.785-841
3. E.Psillakis, N.Kalogerakis, (2003), Trends in Analytical Chemistry, 22(10), 565-574
4. R.M Smith, (2003), J. of Chrom. A, 1000, 3-27
5. E.Psillakis, N.Kalogerakis, (2004), Trends in Analytical Chemistry, 23(1), 1-10
6. J. K. Lokhnauth, (2005), '*Solid Phase Microextraction and Stir Bar Sorptive Extraction Coupled to Ion Mobility Spectrometry*', Dissertation
7. H.Lord, J.Pawliszyn, (2000), J. of Chrom. A, 885 (review), pp 153-193
8. C.L. Arthur, J. Pawliszyn, (1990), Anal. Chem., 62, 2145-2148
9. H. Liu, P.K. Dasgupta, (1996), Anal. Chem., 68, 1817-1821
10. M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, (1997), Anal. Chem., 69, 235-239
11. M.Charalabaki, E.Psillakis, D.Matzavinos, N.Kalogerakis, (2005), Chemosphere 60, 690-698
12. E.Psillakis, A. Ntelekos, D.Matzavinos, E.Nikolopoulos and N.Kalogerakis, (2003), J. Environ. Monit, 5,135-140
13. E.Yiantzi, E.Psillakis, K. Tyrovola, N.Kalogerakis, (2010), Talanta, 80, 2057-2062
14. L. Yangcheng, L. Quan, L. Guangsheng, D. Youyuan, (2006), Anal. Chim. Acta, 566, 259-264
15. M.R.K. Zanjani, Y. Yamini, S. Shariati, J.A. Jonsson, (2007), Anal. Chim. Acta, 585, 286-293
16. J. Pawliszyn, (1997), '*Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice*', Wiley-VCH, New York
17. C. Ross, J. Pawliszyn, (2005), Elsevier,902, 608-616
18. B. Boland A.A., J. Pawliszyn, (1996), Analytical Chemistry, 68, 1521-1529
19. J. Pawlszyn, S. Pedersen-Bjergaard, (2006), Trends.J. Chromatogr. Sci., 44, 291-307.
20. T. Górecki and J. Pawlszyn, (1997), Analyst, 122, 1079-1086
21. Z. Zhang and J. Pawlszyn, (1993), Anal. Chem., 65, 1843-1852
22. M. Alaei, R. M. Whittal, W. M. J. Strachan, (1996), Pergamon,96, 1-8
23. Dj. DjozN and Y. Assadi, (1999), Microchemical J., 63, 176-284
24. E. Manoli, C.Samara (1999), Trends in analytical chemistry, 18 (6), 417-428
25. WHO,2003-www.ispac.org
26. J. Ai, (1997), Anal. Chem. 69, 3260
27. S. Risticvic, H.Lord, T. Górecki, C.L.Arthur, J. Pawlszyn, (2010) Nat. Protoc. 59 122
28. N.P. Brunton, D.A Cronin, F.J. Monahan, (2001), J. Chromatogr. A 16 294
29. J. Darouzes, M. Bueno, C. Pecheyran, M. Holeman, M.J. Portin-Gautier, (2005), J. Chromatogr. A, 19, 1072 19
30. E. Psillakis, E.Yiantzi, L. Sanchez-Prado, N. Kalogerakis, Anal. Chim. Acta, In Press, Accepted Manuscript (DOI: 101016/j.aca.2012.01.019)
31. P.S. Liss, P.G.Slater, (1974), Nature, 74, 247-181

32. D. Mackay, P.J. Leinonen, (1975), Environ. Sci. Technol. 9, 1778
33. R.H Perry, D.W. Green, Perry's Chemical Engineers' Handbook-7th Edition, McGraw-Hill, New York, 1997
34. C.Munz, P.V. Roberts, (1989), Water. Res.23, 589
35. I. Bruheim, X. Liu, J. Pawliszyn, (2003), Anal. Chem. 75, 1002
36. J.H. Smith, D.C. Bomberg, D.L. Haynes, (1981), Environ. Chemosphere, 10, 281
37. J.H. Smith, D.C. Bomberg, D.L. Haynes, (1980), Environ. Sci. Technol. 14, 1332
38. M.F. Alpendurada, (2000), J.Chrom. A, 889, 314
39. A.M.Y. Yamini, N. Alizadeh, (2005), J.Chrom. A, 1063, 1-18
40. C. Bicchì, S. Drigo, P. Rubiolo, (2000), J.Chrom. A, 882, 469-485
41. A. Ghiasvand, S. Hosseinzadeh, J. Pawlszyn, (2006), J.Chrom. A, 1124, 35-42
42. H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawlszyn, (2000), J.Chrom. A, 880, 35-62
43. Serdar Özer (2005) "*Measurement of Henry's Law Constant of Organochloro Pesticides*", Thesis for the Degree of Master of Science.
44. R. Eisert, J. Pawlszyn, (1997), J.Chrom. A, 776, 293-303
45. I. Bruheim, X. Liu, and J. Pawlszyn, (2003), Anal. Chem. 75, 1002-1010
46. E. Psillakis, A. Mousouraki, E. Yiantzi, N. Kalogerakis, (2012), J.Chrom. A, 1244, 55-60