

# Ποσοτικός προσδιορισμός Φουλερενίου $C_{60}$ σε δείγματα νερού.



Ροδόπη Ζουμπουλάκη

Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος

Εξεταστική επιτροπή:

Ελευθερία Ψυλλάκη (επιβλέπουσα)

Νικόλαος Καλογεράκης

Κωνσταντίνος Χρυσικόπουλος

Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά [Ιούλιος 2015]

## Αφιέρωση

Η διπλωματική μου εργασία αφιερώνεται σε όλους τους νέους συναδέλφους μηχανικούς που δεν χάνουν ευκαιρίες για να αναπτύξουν τις πραγματικές τους δυνατότητες και τολμάνε να ανοίξουν τα φτερά τους σε νέους ουρανούς.

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα από καρδιάς να ευχαριστήσω τους φίλους και συναδέλφους, Μαρκέλλα Σιάκα, Αντώνη Αποστολάκη και Αλέξανδρο Δημητρίου για την συνεργασία μας, καθ' όλη την ακαδημαϊκή μας πορεία στο ΠΚ. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Ψυλλάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω σε ένα πρωτοπόρο θέμα. Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω την πολύτιμη συνεργασία με τις Ελένη Δόβρου, Έφη Κουρουνιώτη και φυσικά τη καθοδήγηση της Δρ. Ελίνας Γιαντζή στο εργαστήριο Υδατικής Χημείας.

## Περιεχόμενα

1.	Εισαγωγή.....	3
1.1	Ορισμοί .....	3
1.2	Ανακάλυψη-Τομείς εφαρμογής.....	3
1.3	Φυσικές και Χημικές ιδιότητες C <sub>60</sub> .....	4
1.4	Επίδραση στους ζωντανούς οργανισμούς.....	6
1.5	Συγκεντρώσεις στη φύση.....	6
1.6	Τύχη στο περιβάλλον.....	6
1.6.1	Φωτοχημική μετατροπή.....	7
1.6.2	Μεταφορά με τη μορφή αεροζόλ.....	8
1.7	Όρια-νομοθεσία.....	9
1.8	Μέθοδοι για την δημιουργία stock υδατικών διαλυμάτων.....	9
1.9	Υπάρχουσες μέθοδοι προετοιμασίας δείγματος.....	9
1.10	Η προτεινομένη μέθοδος προετοιμασίας δείγματος.....	10
1.11	Βελτιστοποίηση της μεθόδου. Παράγοντες που επηρεάζουν τη VALLME.....	11
1.12	Αναλύσεις με χρωματογραφία .....	12
1.13	Σκοπός.....	13
2	Πειραματικό μέρος .....	14
2.1	Υλικά.....	14
2.2	Προετοιμασία διαλυμάτων και ανάλυσης.....	14
2.2.1	Παρασκευή υδατικού stock διαλύματος με την μέθοδο προς παρατ. ανάδευσης.....	14
2.2.2	Παρασκευή οργανικών διαλυμάτων C <sub>60</sub> .....	15
2.2.3	Μέθοδος VALLME .....	15
2.2.4	Αναλύσεις με HPLC.....	16
3	Αποτελέσματα και συζήτηση .....	17
3.1	Φάσματα απορρόφησης UV-Vis του C <sub>60</sub> σε διάφορους διαλύτες.....	17
3.2	Μέτρηση συγκέντρωσης aq/nC <sub>60</sub> stock διαλύματος .....	18
3.3	Βελτιστοποίηση παραμέτρων εκχύλισης.....	19
3.4	Γραμμικότητα μεθόδου σε LC-MS με χρήση βέλτιστων συνθηκών .....	24
3.5	Εφαρμογή βέλτιστων συνθηκών σε μήτρα νερού βρύσης.....	25
4	Επίλογος-Προτάσεις.....	26
	Βιβλιογραφία .....	27

# 1. Εισαγωγή

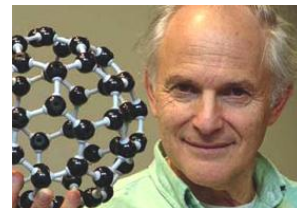
## 1.1 Ορισμοί

Ως νανοϋλικά (Nanomaterials-NM) ορίζονται τα υλικά με μία διάσταση μικρότερη των 100 nm, ενώ νανοσωματίδια (Nanoparticles-NP) ορίζονται τα υλικά με τουλάχιστον δύο διαστάσεις μεταξύ 1 και 100 nm (Klaine et al., 2008). Μια υποκατηγορία των νανο-υλικών είναι τα φουλερένια, τα οποία είναι αλλοτροπικές μορφές άνθρακα (ενώσεις που αποτελούνται αποκλειστικά από άτομα άνθρακα) με σφαιρική δομή. Τα κατασκευασμένα νανοσωματίδια ονομάζονται ENPs (Engineered Nanoparticles).

Τα νανοσωματίδια υπήρχαν ανέκαθεν στην γη τόσο από φυσικές, όσο και από ανθρωπογενείς πηγές. Ωστόσο, πρόσφατα έγινε αντιληπτό ότι τα νανοσωματίδια κατέχουν ενισχυμένες ή ακόμα μοναδικές μηχανικές, καταλυτικές και οπτικές ιδιότητες, όπως και ηλεκτρική αγωγιμότητα, κυρίως λόγω του νανομεγέθους τους (Klaine et al., 2008). Η όλο και αυξανόμενη ικανότητα μας να συνθέτουμε και να μεταχειριζόμαστε τέτοια υλικά είχε ως αποτέλεσμα την παγκόσμια αύξηση στις επενδύσεις για έρευνα και ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας. Σήμερα, τα υλικά νανοκλίμακας βρίσκουν εφαρμογή σε ποικιλία τομέων όπως, ηλεκτρονική, βιοϊατρική, φαρμακευτική, κοσμετολογία, ενέργεια, περιβάλλον, κατάλυση και εφαρμογές υλικών (Sanchís et al., 2011), πράγμα που υποδηλώνει ότι αυτά τα υλικά αναμένονται στις εκροές των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων και συνεπώς στο υδατικό περιβάλλον.

## 1.2 Ανακάλυψη-Τομείς εφαρμογής

Το φουλλερένιο  $C_{60}$  ανακαλύφθηκε το 1985 από τον Harry Kroto και τους συνεργάτες του στο Rice University, ο οποίος βραβεύτηκε το 1996 με το Nobel χημείας (Kroto et al., 1985). Ο ίδιος ονόμασε το  $C_{60}$  Buckminsterfullerene (επίσης γνωστό και ως buckyball), προς τιμήν του Buckminster Fuller (1895 – 1983), Αμερικάνου αρχιτέκτονα, ο οποίος είχε συλλάβει την ιδέα των γεωδαιτικών δομών.



Εικόνα 1, Harry Kroto

Το  $C_{60}$  έχει δομή κατατετμημένου (truncated) εικοσάεδρου, δεδομένο που το καθιστά το πιο συμμετρικό μόριο. Συγκεκριμένα, έχει 60 άτομα άνθρακα, διευθετημένα στο χώρο σε 12 πεντάγωνα και 20 εξάγωνα. Κάθε άτομο άνθρακα συνδέεται με τρία γειτονικά άτομα με  $sp^2$  υβριδισμένα τροχιακά.

Τα φουλερένια παράγονται τεχνητά, αλλά επίσης σχηματίζονται και στην φύση (ηφαίστεια και πυρκαγιές) και στο ανθρωπογενές, από την καύση ορυκτών καυσίμων. Προϊόντα φουλερενίων βρίσκονται ήδη στην αγορά και η παραγωγή τους φτάνει τους τόνους ανά έτος (Xie et al., 2008) σε εργοστάσια με δυναμικό μέχρι 1500 t/year. Συνεπώς, είναι αναμφίβολο το γεγονός ότι ένα ποσοστό από αυτά τα υλικά, τα οποία διατίθενται ως προϊόντα επιτυχούς νανοχημείας, θα καταλήξουν στο περιβάλλον. Παρόλο που η τοξικότητα του  $C_{60}$  είναι αμφιλεγόμενο θέμα, πρόσφατες μελέτες έχουν αναφέρει τοξικότητα σε

μικροοργανισμούς, υδρόβια ήδη και ανθρώπινα κύτταρα (Andrievsky and Klochkon, 2005; Li et al., 2009). Αυτά τα ευρήματα εγείρουν ανησυχία για τις επιπτώσεις του C<sub>60</sub> στον άνθρωπο και τα οικοσυστήματα και απαιτούν καλύτερη κατανόηση της παρουσίας και της συμπεριφοράς του C<sub>60</sub> στο υδάτινο περιβάλλον.

Το φουλερένιο C<sub>60</sub> χρησιμοποιείται για εφαρμογές στον τομέα των ηλεκτρονικών, οπτικών, κοσμετολογίας, φαρμακολογίας και ενέργειας. Παραδείγματα από προϊόντα που περιέχουν C<sub>60</sub> είναι ρακέτες τένις, αντιηλιακά και αντιοξειδωτικές κρέμες προσώπου (Hotze et al., 2008). Σε τέσσερα καλλυντικά προϊόντα (κρέμες και σέρουμ προσώπου) που μελετήθηκαν (Benn et al., 2011; Richardson, 2012) βρέθηκε η συγκέντρωση του C<sub>60</sub> να κυμαίνεται από 0.04-1.1 μg/g. Μια μονή δόση (0.5 g) μπορεί να περιέχει μέχρι και 0.6 μg C<sub>60</sub>.

### 1.3 Φυσικές και Χημικές ιδιότητες C<sub>60</sub>

Ένα πολύ χαρακτηριστικό στοιχείο των μορίων του C<sub>60</sub> είναι ότι δίνουν διαλύματα πολύ έντονου χρώματος. Τολουολικό διάλυμά έχει πολύ έντονο μωβ χρώμα διότι απορροφά στο εύρος 300-400 nm, το οκτανολικό ροζ, ενώ τα υδατικά αποκτούν πυρόξανθο χρώμα.



Εικόνα 2, Αριστερά τολουολικό και δεξιά οκτανολικό διάλυμα C<sub>60</sub>.

Αναμφίβολα, η πιο ενδιαφέρουσα ιδιότητα του C<sub>60</sub> είναι η χρονικά εξαρτώμενη ικανότητα μετάβασής του από υδρόφοβη σε πολική μορφή. Για παράδειγμα, η διαλυτότητα του στερεού C<sub>60</sub> στο νερό εκτιμάται στο εύρος  $1.11 \cdot 10^{-11}$  -  $1.8 \cdot 10^{-20}$  M και θεωρείται πρακτικά αδιάλυτο στο νερό (Abraham et al., 2000; Heymann, 1996; Jafvert and Kulkarni, 2008). Ωστόσο, έπειτα από εκτεταμένη έκθεση στο νερό, μπορεί να μετατραπεί σε υδρόφιλο, καθώς σχηματίζει σχετικά σταθερά συσσωματώματα διαμέτρου 25-500 nm (nano-C<sub>60</sub>) τα οποία είναι φορτισμένα (Fortner et al., 2005), γεγονός που οδηγεί σε μετρούμενες συγκεντρώσεις οι οποίες είναι 11 τάξεις μεγέθους μεγαλύτερες από την αρχική διαλυτότητα σε υδρόφοβη μορφή (Andrievsky et al., 2002; Isaacson et al., 2009; Ma and Bouchard, 2009). Ο κύριος μηχανισμός πίσω από την σταθερότητα του nC<sub>60</sub> έχει αναφερθεί ως απωστικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις: ένα αποτέλεσμα της απόκτησης αρνητικά φορτισμένης επιφάνειας σε συσσωματώματα (Brant et al., 2006; Ma and Bouchard, 2009). Παρόλο που το nC<sub>60</sub> είναι φυσιολογικά μη ιονικό, προηγούμενες έρευνες έχουν μετρήσει αρνητικό επιφανειακό δυναμικό σε εύρος -9 με -30 mV (σε pH εύρους 5-6) για τα συσσωματώματα C<sub>60</sub> (Deguchi et al., 2001; Klochkon and Andrievsky, 1997).

Μερικές θεωρίες που έχουν διατυπωθεί για να εξηγήσουν την προέλευση του φορτίου στο C<sub>60</sub>, περιλαμβάνουν: την ρόφηση από άλλα ιονισμένα ήδη (όπως ιόντα υδροξυλίου), μεταφορά φορτίου από οργανικό διαλύτη (πχ. THF) και φωτολυτικές διεργασίες που προέρχονται από την δόμηση του νερού στην επιφάνεια του (Brant et al., 2005; Deguchi et al., 2001; Klochkon and Andrievsky, 1997). Ωστόσο, κάθε μια από τις προτεινόμενες θεωρίες

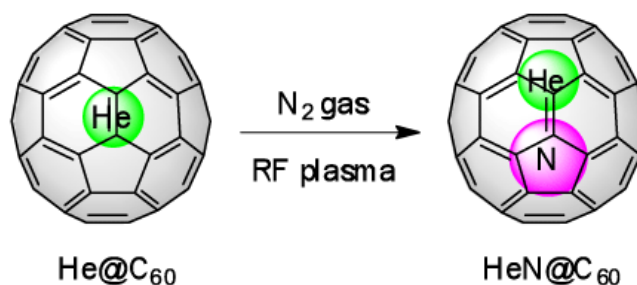
βασίζεται σε παρατήρηση του  $nC_{60}$  σε απλά διαλύματα και συνεπώς δεν περιγράφουν πλήρως την φορτισμένη συμπεριφορά του  $nC_{60}$  σε πιο πολύπλοκα και περιβαλλοντικώς πιο αντιπροσωπευτικά διαλύματα, όπου η έκταση του φορτίου βασίζεται σε άλλους παράγοντες όπως το pH (Brant et al., 2005), τα ιονικά συστατικά και η παρουσία άλλων ενώσεων, ικανές να μοιραστούν ηλεκτρόνια ή να οξειδώσουν την επιφάνεια του  $C_{60}$  (Chen and Elimelech, 2007; Li et al., 2009; Terashima and Nagao, 2007; Xie et al., 2008).

Ο σχηματισμός των κolloειδών συσσωματωμάτων είναι μια πολύπλοκη και δυναμική διεργασία. Το μέγεθος και το σχήμα των συσσωματωμάτων ποικίλουν έντονα, με τα μικρά συσσωματώματα να τείνουν σε σφαιρικό σχήμα, τα μεσαίου μεγέθους σε ορθογωνικό και τα πολύ μεγάλα έχουν κυρίως τριγωνικό σχήμα (Fortner et al., 2005). Ενώ οι παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος είναι το pH, ο ρυθμός προσθήκης νερού (Chen et al., 2008).

Aqueous solubility of $C_{60}$ (Heymann, 1996)	$1.11 \cdot 10^{-11} - 1.8 \cdot 10^{-20} \text{ M}$
Max. observed concentration of $nC_{60}$ aggregates (Bouchard and Ma, 2008)	235 mg/L
Solubility in octanol (Heymann, 1996)	47 mg/L
Solubility in toluene (Sivaraman et al., 1992)	2150 mg/L
$\log K_{ow}$ (Jafvert and Kulkarni, 2008)	6.67
$\log K_{tw}$ (Jafvert and Kulkarni, 2008)	8.44

Πίνακας 1, Συγκεντρωτικός πίνακας για την διαλυτότητα του  $C_{60}$  σε διάφορους διαλύτες.

Λόγω της δομής του  $C_{60}$ , έχουν πραγματοποιηθεί περάματα σχετικά με την ικανότητα του  $C_{60}$  να εσωκλείει στο εσωτερικό του άλλα μόρια δημιουργώντας τα λεγόμενα ενδοφουλερένια (endofullerenes). Αυτή η ικανότητα θα μπορούσε να φανεί χρήσιμη στην βιοϊατρική αφού φάρμακα θα μπορούν να μεταφερθούν μέσω του  $C_{60}$  και να απελευθερωθούν σε συγκεκριμένο χρόνο και τόπο, υπό τις εκάστοτε επιθυμητές συνθήκες. Μέχρι τώρα, έχει επιτευχθεί η ενσωμάτωση των μορίων  $H_2O$ ,  $H_2$ ,  $N_2$ , He, HeN σε κλειστό (Kurotobi and Murata, 2011; Murata et al., 2003) και  $CO$ ,  $CH_4$ , N,  $N_2$  σε ανοιχτό (Shi et al., 2013; Suetsuna et al., 2002) μόριο  $C_{60}$ .



Εικόνα 3, Παραγωγή  $HeN@C_{60}$  (Morinaka et. al. 2013)

Ωστόσο, αυτή η ιδιότητα μπορεί να έχει αρνητική επίδραση στο περιβάλλον αφού μπορεί να συμβάλλει στην μεταφορά ρύπων.

Επίσης, τα φουλερένια είναι ικανά να σχηματίσουν πλέγμα με άλλα άτομα, πράγμα που επηρεάζει τις ιδιότητες τους. Για παράδειγμα, το  $C_{60}$  είναι μονωτής αλλά όταν σχηματίσει πλέγμα με τρία άτομα καλίου ( $K_3C_{60}$ ) γίνεται υπερ-αγωγός, ενώ με έξι άτομα  $K^+$  ( $K_6C_{60}$ ) είναι μονωτής.

#### 1.4 Επίδραση στους ζωντανούς οργανισμούς

Το  $C_{60}$  μπορεί να λειτουργήσει σαν αντιοξειδωτικό προλαμβάνοντας την καταστροφή των κυττάρων ή τον θάνατο τους από τις ελεύθερες ρίζες (Chen and Ding, 2012). Γι' αυτό τον λόγο χρησιμοποιείται στην ιατρική και την κοσμετολογία. Ωστόσο, στην μορφή συσσωματωμάτων ( $nC_{60}$ ) μπορεί να οξειδώσει ανθρώπινα κύτταρα και το DNA λόγω της κυτταροτοξικότητας και γενετοξικότητας. Σημειώνεται ότι έχει παρατηρηθεί γενετοξικότητα στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα σε συγκέντρωση 2.2μg/L (Dhawan et al., 2006).

#### 1.5 Συγκεντρώσεις στη φύση

Το  $C_{60}$  κατατάσσεται στους Ανερχόμενους Οργανικούς Ρύπους (Emerging Organic Pollutants). Στο Ηνωμένο Βασίλειο, υπολογίζεται ότι η συγκέντρωση του  $C_{60}$  στο νερό ανέρχεται στα 0.31μg/L (Boxall et al., 2007). Ενώ αν ληφθεί υπόψιν και καθίζηση, τότε αναμένεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις της τάξης των 0.003-0.021 ng/L. Επίσης, όπως έχει αποδειχθεί, το φουλερένιο δεν απομακρύνεται πλήρως από τις συμβατικές μεθόδους επεξεργασίας πόσιμου νερού (κροκίδωση-συσσωμάτωση, καθίζηση, φίλτρανση) ενώ η παρουσία του στην έξοδο Ε.Ε.Α υπολογίζεται μέχρι και 33 ppt (Gottschalk et al., 2009; Wezel et al., 2011).

#### 1.6 Τύχη στο περιβάλλον

Όπως αναφέρεται τα συσσωματώματα δεν παραμένουν σε διαλύματα με ιοντική ισχύ που προσομοιάζει θαλασσινό ή υφάλμυρο νερό  $I \geq 0.1$ . Ωστόσο, σε ιοντική ισχύ χαμηλότερη του 0.05 ένα ποσοστό, αν όχι το σύνολο (0.01 και 0.001 l) των συσσωματωμάτων παραμένουν σταθερά για 15 εβδομάδες (Fortner et al., 2005).

Η πρώτη γραμμή άμυνας για τους έμβιους οργανισμούς είναι η κατανάλωση πόσιμου νερού. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το  $C_{60}$  δεν απομακρύνεται επαρκώς από τις πρώτες διεργασίες επεξεργασίας πόσιμου νερού, επηρεάζεται όμως από το στάδιο της απολύμανσης (χλωρίωση και οζόνωση) (Alpatova et al., 2013; Fortner et al., 2007). Συγκεκριμένα, η αντίδραση του  $nC_{60}$  με το όζον έχει ως παράγωγα υδατοδιαλύτα οξείδια φουλερενίου σε ποικίλα σχήματα συσσωματωμάτων, ενώ κατά τη χλωρίωση, τα άτομα χλωρίου δημιουργού ομοιοπολικούς δεσμούς με τα άτομα του άνθρακα. Συνεπώς, απαιτείται περεταίρω διερεύνηση της τοξικότητας των παραπροϊόντων της απολύμανσης.

Το  $C_{60}$  είναι πολύ πιθανόν να ελευθερωθεί στο περιβάλλον μαζί με επιφανειοδραστικές ουσίες οι οποίες περιέχονται στα προϊόντα οικιακού καθαρισμού και προσωπική φροντίδας.

Μια πρόσφατη έρευνα (Wang et al., 2012) έδειξε ότι η επίδραση ουδέτερων ή αρνητικά φορτισμένων ουσιών ήταν αμελητέα ενώ αντίθετα οι κατιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες μείωσαν σημαντικά την κινητικότητα του  $C_{60}$  μέσα στο χώμα.

Για τον προσδιορισμό της κίνησης και της βιοδιαθεσιμότητας του  $C_{60}$  στο χώμα, είναι απαραίτητο να προσδιοριστούν τρεις διεργασίες: ρόφηση, αποδόμηση και δέσμευση από τα φυτά. Σε πρόσφατη έρευνα του R. Avanasī, διαπιστώθηκε ότι ο οργανικός άνθρακας παίζει σημαντικό ρόλο στην ρόφηση του  $C_{60}$  στο χώμα με συντελεστή κατανομής  $\log K_{oc}$  να υπολογίστηκε 3.55-4.00 (Avanasī et al., 2014). Η παραγωγή  $CO_2$  ήταν πολύ χαμηλή που υποδηλώνει την αντίσταση του ρύπου για ανοργανοποίηση μέσα στο χώμα. Τέλος, η δέσμευση του  $C_{60}$  από τα ραπανάκια (*Raphanus sativus*) είναι χαμηλή (~7%), από το οποίο το μεγαλύτερο μέρος συγκρατείται στις ρίζες (40-47%), και λιγότερο ποσοστό (22-23%) στο βολβό, (12-16%) στο βλαστό και (18-22%) στα φύλλα.

#### 1.6.1 Φωτοχημική μετατροπή

Η φωτοχημική μετατροπή μπορεί να είναι σημαντική για την τύχη του  $C_{60}$  σε υδατικό περιβάλλον, λόγω της ισχυρής απορρόφησης ακτινοβολίας εντός του ηλιακού φάσματος (Hotze et al., 2008). Σε προηγούμενη έρευνα, υδατικά συσσωματώματα αποδείχτηκε ότι μετατρέπονταν, σε UV ακτινοβολία 254 nm (Lee et al., 2009), δημιουργώντας υδατοδιαλυτά παράγωγα τα οποία περιέχουν πολλαπλά υδροξύλια και λειτουργικές ομάδες οχυγόνου, όμοιες με αυτές στις εμπορικές φουλερενόλες. Επιπροσθέτως, έχει αναφερθεί και η κινητική φωτομετατροπής του  $C_{60}$  σε υδατικά  $nC_{60}$  διαλύματα στο ηλιακό φως κάτω από διάφορες συνθήκες και για μεγάλους χρόνους έκθεσης σε ακτινοβολία (Hou and Jafvert, 2008). Στην ίδια μελέτη, η παρουσία φουλβικού οξέος, αλλαγές στο pH, και η μέθοδος προετοιμασίας των συσσωματωμάτων, βρέθηκαν να έχουν ελάχιστη επίδραση στο ρυθμό φωτομετατροπής. Σε άλλη έρευνα όπου μελετήθηκε η επίδραση φυσικής οργανικής ύλης (NOM) στη διασπορά του  $C_{60}$ , οι συγγραφείς κατέληξαν στο γεγονός ότι η διεργασία της διασποράς μπορεί να επιταχυνθεί με την βοήθεια του ηλιακού φωτός (Xie et al., 2008). Τέλος, οι φωτοχημικές επιδράσεις του ηλιακού φωτός στο  $C_{60}$ , η εξάρτηση του μήκους κύματος από τις φωτομετατροπές και τα φωτοπροϊόντα που σχηματίστηκαν, ερευνήθηκαν με σκοπό την αξιολόγηση της φωτομετατροπής του  $C_{60}$  που μπορεί να επέλθει στο φυσικό περιβάλλον (Hou et al., 2010). Αξίζει να σημειωθεί ότι, η φωτομετατροπή των φουλερενίων στο νερό, βρέθηκε να περιπλέκεται από την χαμηλή διαλυτότητα αυτών των υλικών στο νερό (Hotze et al., 2008). Επίσης, όλες οι προηγούμενες αναφορές ασχολήθηκαν με σχετικά απλά διαλύματα τα οποία ίσως να μην αναπαράγουν πραγματικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Ωστόσο το φυσικό νερό είναι πολύπλοκο και διάφορα συστατικά μπορεί να αλληλοεπιδράσουν με το  $C_{60}$  και συνεπώς στην διεργασία της φωτομετατροπής.

Ωστόσο, η ακτινοβολία δεν έχει την δυνατότητα μόνο να μετατρέψει τα ήδη διαλυμένα  $nC_{60}$  αλλά μπορεί και να συνεισφέρει στην διάλυση στερεού  $C_{60}$  στο νερό. Σε πρόσφατη έρευνα

αναφέρεται (Wu et al., 2014) ότι η διάλυση του στερεού  $C_{60}$  στο νερό εξαρτάται από την ένταση της ακτινοβολίας, το μήκος κύματος και την συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου.

#### 1.6.2 Μεταφορά με τη μορφή αεροζόλ

Η μεγαλύτερη πλειοψηφία των ουσιών που έχουν μελετηθεί στην διεπιφάνεια νερού-αέρα είναι αμφίφυλα μόρια, των οποίων η δομή περιέχει και υδρόφοβο και υδρόφιλο τμήμα. Η ιδιότητα της αμφιφυλίας οδηγεί συχνά σε συσσωμάτωση και αρκετά μεγάλες δομές.

Υλικά που δημιουργούν φιλμ, είναι πολύ πιο δύσκολο να μελετηθούν στην διεπιφάνεια νερού-αέρα, επειδή η τάση τους για αυτό-ένωση είναι πολύ μεγαλύτερη από την ικανότητά τους να διασπείρονται στην επιφάνεια του νερού (Back and Lennox, 1992). Παρά το γεγονός ότι το στερεό  $C_{60}$  δεν διαθέτει αμφίφυλο χαρακτήρα, έρευνες έδειξαν ξεκάθαρο σχηματισμό φιλμ  $C_{60}$  στην διεπιφάνεια νερού-αέρα και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα φουλερένια τείνουν να συσσωματώνονται στην διεπιφάνεια νερού-αέρα (Back and Lennox, 1992; Obeng and Bard, 1991).

Γενικότερα, η ικανότητα των νανοσωματιδίων να μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις μέσω του αέρα, του νερού και των ζώων είναι πιθανό να εξαρτάται άμεσα από μια σειρά παραγόντων συμπεριλαμβανομένου το μέγεθος των σωματιδίων όπως και τις χημικές ιδιότητες του υπό μελέτη μέσου. Η θαλάσσια μικρο-επιφάνεια έχει την ικανότητα να ροφά νανοσωματίδια και να τα μεταφέρει σε υδάτινα περιβάλλοντα σε μεγάλες αποστάσεις. Ωστόσο, έρευνες που ασχολούνται με άλλη κλάση χαμηλής πτητικότητας οργανικών ουσιών, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ενώ τα ωκεάνια ρεύματα έχουν ένα ρόλο στην μακρινή μεταφορά, η μεταφορά αυτή είναι αργή και αυτό το flux, ίσως να μην συνεισφέρει σημαντικά στην μόλυνση των ζωντανών οργανισμών. Ακόμα δεν μπόρεσαν να εξηγήσουν την παρουσία αυτών των ενώσεων σε απομακρυσμένα μέρη, χωρίς υδρολογική σύνδεση με πιθανές πηγές, ή στον Αρκτικό κύκλο που είναι γνωστό ότι ρυπαίνεται μόνο από την ατμόσφαιρα (Young et al., 2007). Αντιθέτως, τα τεχνητά νανοσωματίδια μπορεί να παραμένουν αερομεταφερόμενα για μεγάλες περιόδους, λόγω του μικρού μεγέθους και του χαμηλού βάρους τους. Παρόλο που αυτό αυξάνει την πιθανότητα να ταξιδεύουν μεγάλες αποστάσεις, αυτή η μεταφορά συνήθως αφορά μεμονωμένες περιπτώσεις, καθώς περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις με αέρια και άλλα αερομεταφερόμενα σωματίδια. Το 2012 περιεγράφηκε η παρουσία των δεσμευμένων αεροζόλ φουλερενίων στην Μεσόγειο θάλασσα (Sanchís et al., 2011). Οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν μοντέλο αντίστροφης πορείας και κατέληξαν στο ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις των φουλερενίων σχετίζονταν με τις αέριες μάζες οι οποίες κυκλοφορούν πάνω από περιοχές με έντονη βιομηχανική δραστηριότητα, παρά το γεγονός ότι οι μεταβολές στον λόγο  $C_{70}/C_{60}$  υποδηλώνουν πολλαπλές πηγές. Η πιθανότητα ότι τα υδατικά μέσα δεν είναι μόνιμες αποθήκες για φουλερένια και μπορεί στην πραγματικότητα να λειτουργούν σαν πηγή αέριων φουλερενίων μέσω της δημιουργίας θαλάσσιου αεροζόλ, δεν είχε ληφθεί ποτέ υπόψιν στο παρελθόν. Τα αεροζόλ αποτελούν μία σημαντική τάξη ατμοσφαιρικής διεπιφάνειας λόγω

της μεγάλης αναλογίας επιφάνειας προς όγκο. Το θαλάσσιο αεροζόλ, το οποίο αποτελεί ένα μεγάλο τμήμα του ατμοσφαιρικού αεροζόλ, είναι γνωστό ότι δημιουργείται από την παραγωγή φυσαλίδων αερίου και την καταστροφή τους κατά το σπάσιμο των κυμάτων και λόγω των αντίξωων θαλάσσιων συνθηκών (Donaldson and Vaida, 2006). Η επιφανειακή μικρο-στρώση ενσωματώνεται σε μικροσταγόνες αεροζόλ, υποδηλώνοντας ότι ευνοείται η μεταφορά των φουλερενίων από το νερό στην ατμόσφαιρα (Marcomini et al., 2001).

### 1.7 Όρια-νομοθεσία

Είναι σαφές ότι λόγω των ποικίλων ιδιοτήτων τους, τα νάνο-υλικά δεν μπορούν να εξεταστούν για τις επιπτώσεις τους ως ένα σύνολο. Είναι απαραίτητο να γίνει ανάλυση επικινδυνότητας για κάθε νάνο-υλικού ξεχωριστά. Αυτό είναι μια χρονοβόρα διαδικασία, με αποτέλεσμα να μην έχει οριστεί ακόμα σαφές νομοθετικό πλαίσιο για την διαχείριση των νάνο-υλικών, λόγω ελλειπών δεδομένων.

### 1.8 Μέθοδοι για την δημιουργία stock υδατικών διαλυμάτων.

Στην βιβλιογραφία αναφέρονται δύο τρόποι για την παρασκευή του υδατικού διαλύματος: χρήση υπερήχων για την εξάτμιση τολουολίου (Chen and Ding, 2012; Chen et al., 2008; Wang et al., 2010; Wezel et al., 2011; Xie et al., 2008) και παρατεταμένη ανάδευση (Bouchard and Ma, 2008; Chang and Vikesland, 2011). Σε παλαιότερες δημοσιεύσεις (Deguchi et al., 2001; Fortner et al., 2005) γινόταν χρήση και THF αλλά δεν προτιμάται πλέον λόγω της πολυπλοκότητας αυτής της τεχνικής. Εδώ επιλέχθηκε η μέθοδος της παρατεταμένης ανάδευσης, διότι αντιπροσωπεύει καλύτερα τα συσσωματώματα που συναντάμε στα φυσικά νερά και έχουν δημιουργηθεί με τις πραγματικές περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η ανάδευση λόγω των κυμάτων (Bouchard and Ma, 2008). Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι οι φυσικές ιδιότητες (σχήμα, μέγεθος) των συσσωματωμάτων έχουν αποδειχθεί εξαρτώμενες από την τεχνική που θα εφαρμοστεί για την δημιουργία τους (Bouchard and Ma, 2008; Brant et al., 2006; Fortner et al., 2005) ωστόσο, η υδροξείωση της επιφάνειας των μορίων είναι ανεξάρτητη (Prylutskyy et al., 2014).

### 1.9 Υπάρχουσες μέθοδοι προετοιμασίας δείγματος

Η περιβαλλοντική μελέτη των φουλερενίων βρίσκεται ακόμα στο προοίμιο διότι δεν υπάρχει μία ευρέως αποδεκτή αναλυτική μέθοδος, για την ποσοτικοποίηση ιχνοποσοτήτων αυτών των υλικών (Pérez et al., 2009). Μέχρι σήμερα μόνο ένας περιορισμένος αριθμός επιστημονικών αναφορών ασχολούνται με την ποσοτικοποίηση των φουλερενίων σε επιφανειακά νερά ή λύματα (Farré et al., 2010; Isaacson et al., 2007, 2009). Ενώ η προτεινόμενη μέθοδος για διαχωρισμό υδατικών φουλερενίων είναι χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) συζευγμένη με αναλυτή μάζας ή ανιχνευτή υπεριώδους, μερικές προκλήσεις αναδύονται όταν αναλύονται αυτά τα υλικά σε περιβαλλοντικές μήτρες λόγω των αναλυτικών παρεμποδίσεων που δημιουργούνται κατά την προετοιμασία δείγματος, λόγω έλλειψης υλικών αναφοράς και λόγω της μήτρας των δειγμάτων (Richardson, 2012). Ο

Pycke και οι συνεργάτες του (Pycke et al., 2011) πρόσφατα επανεξέτασαν τις τεχνικές για την ποσοτικοποίηση  $C_{60}$  φουλερενίων σε περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα και κατέληξαν ότι η ικανότητα για ποσοτικοποίηση των φουλερενίων εξαρτάται εκτενώς από την ικανότητα να εκχυλιστούν αυτές οι ουσίες από πολύπλοκες μήτρες. Η χρήση εκχύλισης στερεάς φάσης, γνωστή ως SPE (μία σχετικά ακριβή και πολύβηματική διαδικασία που απαιτεί μεγάλες ποσότητες υδατικού δείγματος), έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε μια προσπάθεια για βελτίωση των ορίων ανίχνευσης για προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων και μείωση της κατανάλωσης του διαλύτη, ωστόσο οι ανακτήσεις, οι οποίες είναι εξαρτώμενες από το είδος της μήτρας, με απλουστευμένο πρωτόκολλο SPE έχουν περιορίσει τις εφαρμογές της (Pycke et al., 2011; Pérez et al., 2009). Υπάρχει ακόμα μεγάλη ανάγκη για προετοιμασία δείγματος χαμηλού κόστους, της οποίας τα πλεονεκτήματα έναντι στις υπάρχουσες μεθοδολογίες θα είναι η ταχύτητα, ο αμελητέος όγκος διαλυτών και η δυνατότητα να επιτρέπεται στους αναλυτές να ανιχνεύονται σε πολύν χαμηλές συγκεντρώσεις όπως οι προβλεπόμενες και πραγματικά περιβαλλοντικά δείγματα.

Κατά την τελευταία δεκαετία, οι προσπάθειες έχουν κατευθυνθεί προς την υγρή-υγρή εκχύλιση (LLE) η οποία επιτυγχάνεται μειώνοντας την αναλογία του οργανικού διαλύτη προς την υδατική φάση. Αυτό οδηγεί στην ανάπτυξη των λεγόμενων τεχνικών μικροεκχύλισης (Psillakis and Kalogerakis, 2003, 2002). Το 2012, μια μέθοδος διεσπαρμένης υγρής-υγρής μικροεκχύλισης (Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction) βασισμένη σε τριαδικό σύστημα διαλυτών, όμοια με αυτή που συναντάται στην ομογενή υγρή-υγρή εκχύλιση και στην εκχύλιση τύπου cloud point, εμφανίστηκε στην βιβλιογραφία, και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των συσσωματωμάτων φουλερενίων στο νερό (Chen and Ding, 2012). Παρόλο που αυτή ήταν η πρώτη ένδειξη ότι η μικροεκχύλιση μπορεί να εφαρμοστεί αποτελεσματικά για τον προσδιορισμό του φουλερενίου, το μόνο της μειονέκτημα είναι η χρήση ενός τρίτου διαλύτη (διαλύτης διάχυσης), ο οποίος συνήθως μειώνει τον συντελεστή κατανομής των αναλυτών στον εκχυλιζόμενο διαλύτη, συνεπώς μειώνοντας την ευαισθησία της μεθόδου (Yiantzi et al., 2009).

### 1.10 Η προτεινόμενη μέθοδος προετοιμασίας δείγματος

Πρόσφατα, αναπτύχθηκε μία νέα, γρήγορη και αρκετά ευαίσθητη μέθοδος μικροεκχύλισης, η επονομαζόμενη VALLME, δηλαδή υγρή-υγρή μικροεκχύλιση υποβοηθούμενη από ανάδευση τύπου δίνης (vortex-assisted liquid-liquid microextraction), κατά την οποία μικρο-όγκος από ένα εκχυλιστικό οργανικό διαλύτη χαμηλής πυκνότητας διαχέεται μέσα σε υδατικό δείγμα χρησιμοποιώντας ανάδευση δίνης, μία διαδικασία ήπιας γαλακτοποίησης (Yiantzi et al., 2009). Τα μικρά σταγονίδια που σχηματίζονται είναι ικανά να εκχυλίσουν τους αναλύτες, φτάνοντας σε ισορροπία ταχύτερα, λόγω της μικρότερης απόστασης διάχυσης και της μεγαλύτερης ειδικής επιφάνειας. Έπειτα από φυγοκέντρηση το εκχύλισμα ανακτάται και η αρχική μικροσταγόνα επανέρχεται στο αρχικό της σχήμα στην επιφάνεια του υδατικού δείγματος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση σε HPLC. Αυτή η νέα, οικονομική και

ευαίσθητη μέθοδος έχει ήδη εφαρμοστεί επιτυχώς για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση ιχνοποσοτήτων αλκυφαινολών, βισφαινόλης-A και άλλων PFOS, που παρουσιάζονται σε υδατικά δείγματα (Paradouroulou et al., 2011; Yiantzi et al., 2009). Σήμερα, η μέθοδος αυτή έχει βρει μεγάλη ανταπόκριση από την διεθνή ακαδημαϊκή κοινότητα και έχει εφαρμοστεί επιτυχώς σε πληθώρα εφαρμογών (Ojeda and Rojas, 2014).

### 1.11 Βελτιστοποίηση της μεθόδου. Παράγοντες που επηρεάζουν τη VALLME.

#### *Είδος οργανικού διαλύτη*

Όπως έχει εξεταστεί παλαιότερα, η 1-οκτανόλη είναι ο μόνος αδιάλυτος στο νερό οργανικός διαλύτης με την ικανότητα να επαναφέρεται σε ανακτήσιμη σταγόνα, συγκριτικά με το τολουόλιο, το n-εξάνιο, οκτάνιο και κυκλοεξάνιο, τα οποία διαχέονται στην επιφάνεια του νερού (Yiantzi et al., 2009).

#### *Επίδραση pH*

Η ρύθμιση του pH μπορεί να έχει καθοριστικό ρόλο στην απόδοση της εκχύλισης καθώς επηρεάζει το σημείο ισορροπίας των διισταμένων ενώσεων και την διαλυτότητα των όξινων/βασικών ενώσεων. Για παράδειγμα, όταν εξετάζεται όξινη ένωση, το pH της υδατικής φάσης προσαρμόζεται στην όξινη περιοχή για να αποφορτιστούν οι κύριες ενώσεις, να μειωθεί η διαλυτότητά τους και να ενισχυθεί η μεταφορά τους στην οργανική φάση.

#### *Επίδραση άλατος*

Ανάλογα με την ουσία που μελετάται, η προσθήκη άλατος μπορεί να μειώσει ή να αυξήσει την διαλυτότητα της στο νερό, συνεισφέροντας έτσι στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης (salting in – salting out effect). Η προσθήκη άλατος μπορεί να έχει θετική, αρνητική ή μηδενική επίδραση.

#### *Όγκος οργανικού διαλύτη και υδατικού δείγματος*

Η αναλογία όγκου δότη/δέκτη αποτελεί βασική παράμετρο για την ευαισθησία της μεθόδου. Όσο μεγαλύτερος ο λόγος δότη/δέκτη πραγματοποιείται μεγαλύτερη προσυγκέντρωση των ουσιών που αναλύονται στην οργανική φάση. Ωστόσο, μεγάλη αύξηση του λόγου μπορεί να επιφέρει τον κίνδυνο διάλυσης της οργανικής φάσης μέσα στην υδατική. Επιπλέον, ο όγκος της οργανικής μικροσταγόνας που θα ανακτηθεί πρέπει να είναι αρκετός για την εισαγωγή του στην αναλυτική συσκευή. Η κατανομή του C<sub>60</sub> στις δύο φάσεις περιγράφεται από τον λόγο της συγκέντρωσής του στην οκτανόλη προς την συγκέντρωσή του στο νερό.

$$K_{ow} = \frac{C_{oct}}{C_{water}}$$

### Ταχύτητα ανάδευσης

Η ανάδευση του διαλύματος χρησιμοποιείται για την επιτάχυνση της εκχύλισης και συγκεκριμένα για την επιτάχυνση επίτευξης ισορροπίας. Με την ανάδευση αυξάνει η επιφάνεια επαφής μεταξύ των μορίων. Οι μέθοδοι ανάδευσης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι είτε με μαγνητικό αναδευτήρα ή την χρήση της συσκευής vortex. Γενικότερα, ο αναδευτήρας τύπου vortex έχει την ικανότητα να περιστρέφει τα υγρά δημιουργώντας δίνη. το μέγεθος και το σχήμα της οποίας καθορίζονται από την ταχύτητα του ρότορα. Στην περίπτωση των αδιάλυτων υγρών, αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σπάσιμο της μιας φάσης σε πολύ μικρά σταγονίδια. Αυτά τα μικρά σταγονίδια μπορούν να εκχυλίζουν τις υπό μελέτη ουσίες αποτελεσματικά, καθώς επιτυγχάνεται ισορροπία γρηγορότερα λόγω της μικρότερης απόστασης διάχυσης και της μεγάλης ειδικής επιφάνειας, το οποίο είναι σημαντικό πλεονέκτημα έναντι του μαγνητικού αναδευτήρα (Yiantzi et al., 2009). Ένα άλλο μειονέκτημα της χρήσης μαγνητικού αναδευτήρα είναι ότι πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν τυχόν αντιδράσεις του διαλύματος με τον πλαστικό ή γυάλινο μαγνήτη.

### Χρόνος ανάδευσης

Η μεταφορά μάζας εξαρτάται από τον χρόνο και ο ρυθμός της ελαττώνεται με την επίτευξη ισορροπίας. Επειδή συνήθως η εκχύλιση είναι μία χρονοβόρα διαδικασία, η επιλογή του χρόνου εκχύλισης βασίζεται στα εξής κριτήρια: επίτευξη ικανοποιητικής προσυγκέντρωσης ιδανικά σε χρόνο μικρότερο από αυτόν της αναλυτικής τεχνικής.

### 1.12 Αναλύσεις με χρωματογραφία

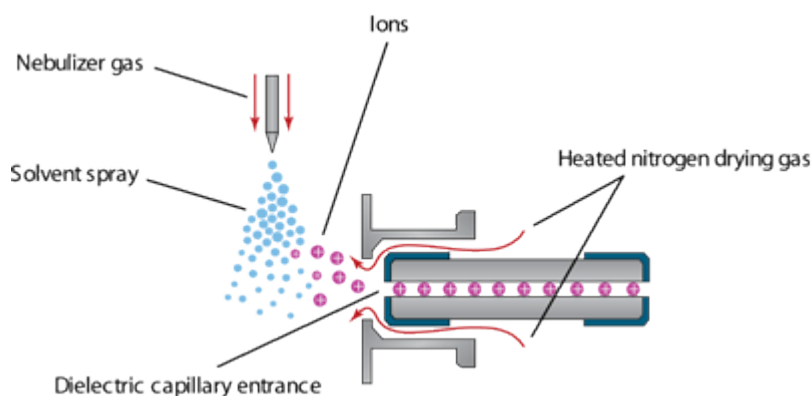
Οι μέθοδοι μικροεκχύλισης ακολουθούνται από μία μέθοδο ανάλυσης για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των κυρίων ενώσεων. Η χρωματογραφία είναι μία μέθοδος διαχωρισμού των συστατικών ενός δείγματος, στην οποία τα συστατικά κατανέμονται ανάμεσα σε δυο μη αναμιγνυόμενες φάσεις, την στατική και την κινητή. Η κυριότερη διαχωριστική μέθοδος που έχει εφαρμοστεί μέχρι τώρα για τον προσδιορισμό του C<sub>60</sub> είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) η οποία αποτελεί εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας στήλης. Σε σχέση με την κλασική χρωματογραφία, διαφέρει καθώς χρησιμοποιεί μικρόκοκκα υλικά πλήρωσης και εφαρμόζονται μεγάλες πιέσεις. Υπερτερεί δε της χρωματογραφίας στήλης, επιτυγχάνοντας ταχύτερους και μεγαλύτερης απόδοσης διαχωρισμούς μιγμάτων.

Ένα σύστημα χρωματογραφίας περιλαμβάνει: φιάλες αποθήκευσης διαλυτών, αντλία, μονάδα εισαγωγής δείγματος, χρωματογραφική στήλη και ανιχνευτή.

Στην HPLC το δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης και με την βοήθεια της κινητής φάσης, τα συστατικά του μετακινούνται με την μορφή ζωνών και τελικά εκλούνται το ένα μετά το άλλο. Οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και κινητής φάσης με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης. Στην HPLC είναι δυνατή η χρήση μίγματος διαλυτών καθώς και η βαθμιαία μεταβολή της

σύστασης της κινητής φάσης. Τέλος, είναι δυνατή η χρήση αναλυτικών στηλών σε σειρά, ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός του μίγματος. Ο χρόνος ανάλυσης είναι συνήθως μικρός, της τάξης των μερικών λεπτών, ενώ η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα της είναι πολύ καλές. Γενικά η HPLC είναι μια ευαίσθητη ποιοτική και ποσοτική αναλυτική τεχνική και γι' αυτό χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό πολλών χημικών ενώσεων.

Η φασματομετρία μάζας αποτελείται από την πηγή ιονισμού, τον αναλυτή μαζών και τον ανιχνευτή, στα οποία το δείγμα εισέρχεται υπό κενό.



Εικόνα 4, Σχηματική αναπαράσταση της πηγής ιονισμού

### 1.13 Σκοπός

Η παραγωγή φουλερενίων σε βιομηχανική κλίμακα, προκαλεί ανησυχίες για τις συνέπειες που μπορεί να έχουν στην ανθρώπινη υγεία και στα οικοσυστήματα, λόγω της (αν και αμφισβητήσιμης) τοξικότητας τους. Μέχρι στιγμής η περιβαλλοντική μελέτη των φουλερενίων βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο λόγω της έλλειψης αναλυτικών τεχνικών και εργαλείων ικανά να ανιχνεύσουν και να ποσοτικοποιήσουν τα ίχνη αυτών των υλικών.

Ο απώτερος σκοπός των σύγχρονων ερευνών, είναι να διερευνήσουν για πρώτη φορά την παρουσία και την τύχη των φουλερενίων (συγκεκριμένα τα  $C_{60}$  και  $C_{70}$ ) σε πραγματικά περιβαλλοντικά δείγματα. Για να γίνει αυτό, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη και επικύρωση μίας ισχυρής μεθόδου ποσοτικοποίησης των συγκεκριμένων ουσιών.

Σκοπός λοιπόν, της παρούσας εργασίας είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός του φουλερενίου  $C_{60}$  (ή αλλιώς Buckminsterfullerene) σε υδατικά δείγματα, με χρήση μίας ευαίσθητης, γρήγορης και χαμηλού κόστους, αναλυτικής μεθόδου βασισμένη στην υγρή-υγρή μικροεκχύλιση υποβοηθούμενη από ανάδευση τύπου δίνης (VALLME), με εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα.

## 2 Πειραματικό μέρος

### 2.1 Υλικά

#### Αντιδραστήρια

- Στερεό Fullerene C<sub>60</sub> 99.5% του οίκου Aldrich
- Toluene puriss. P.a. ACS reagent, Sigma-Aldrich ≥99.7%, Steinheim, Germany
- CAN του οίκου Aldrich, CHROMASOLV® gradient grade, for HPLC, ≥99.9%
- Οξικό οξύ (AcH) glacial 100% anhydrous GR for analysis, Merck, Darmstadt, Germany
- 1-octanol, του οίκου Sigma-Aldrich, CHROMASOLV® for HPLC, ≥99.9%
- Στερεό NaCl της εταιρείας Panreac, Barcelona, Spain
- Στερεό τριένυδρο οξικό νάτριο (NaAc·3 H<sub>2</sub>O) προς εταιρείας Merck, Darmstadt, Germany

#### Όργανα-συσκευές

- Φασματοφωτόμετρο UV/vis Perkin Elmer με λογισμικό Lambda 25
- Φασματοφωτόμετρο UVmini-1240 της εταιρείας Shimadzu, Japan
- Μικροσύριγγα Hamilton των 100μL μοντέλο 710 SNR
- Γυάλινα φιαλίδια των 22mL με βιδωτό πώμα που φέρει black viton septum επικαλυμμένο με Teflon
- Μαγνητική πλάκα ανάδευσης Heidolph MR Hei-standard
- Συσκευή vortex yellow line TTS 2, IKA-works, Wilmington, NC, USA
- Χωνί διήθησης και αντλία κενού
- Φίλτρο πόρων 1μm, διαμέτρου 47 mm, Whatman - GE healthcare, Little Chalfont, UK
- LC-PDA-MC (Agilent Technologies 1200 Series) με λογισμικό ChemStation
- Ανιχνευτής μάζας LC/MS 6110 Single Quadrupole Detector της εταιρείας Agilent
- 250 μL polypropylene inserts για τον auto sampler, της εταιρείας Agilent.
- Όργανα παρασκευής υπερκάθαρου νερού: EASYpure RF και EASYpure II της εταιρείας Barnstead
- Ζυγός Precisa XT 120A
- Φυγόκεντρος Labofuge 400 Heraeus, Kendro Laboratory Products, Germany

### 2.2 Προετοιμασία διαλυμάτων και ανάλυσης

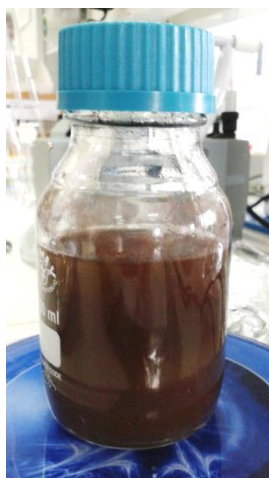
#### 2.2.1 Παρασκευή υδατικού stock διαλύματος με την μέθοδο προς παρατεταμένης ανάδευσης.

Στερεό C<sub>60</sub> σε μορφή μαύρης σκόνης, προστέθηκε σε υπερκάθαρο νερό σε συγκέντρωση 400 mg/L. Το μείγμα αφέθηκε να αναδεύεται σε μαγνητική πλάκα ανάδευσης με 300 rpm για 30 ημέρες σε σκοτεινό δωμάτιο και θερμοκρασία δωματίου (Chang and Vikesland, 2011). Μετά το πέρας των 30 ημερών, το διάλυμα είχε αποκτήσει ένα σκούρο καφέ χρώμα. Έπειτα ακολούθησε διήθηση με φίλτρο πόρων 1 μm. Μετά την διήθηση του C<sub>60</sub> που δεν είχε

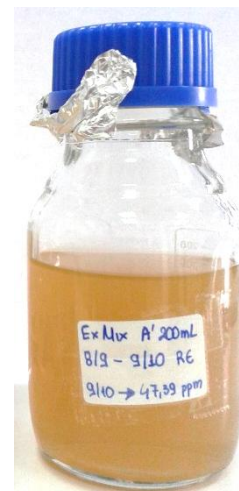
καταφέρει να περάσει στην υδατική φάση, το διάλυμα απέκτησε ένα πυρόξανθο χρώμα και αποθηκεύτηκε σε σκοτεινό χώρο ως υδατικό αq/nC<sub>60</sub> stock διάλυμα.



Εικόνα 5, Πρώτη μέρα ανάδευσης



Εικόνα 6, Μετά την πάροδο 30 ημερών



Εικόνα 7, Το τελικό διάλυμα έπειτα από διήθηση.

### 2.2.2 Παρασκευή οργανικών διαλυμάτων C<sub>60</sub>

Το C<sub>60</sub> όταν διαλυθεί στο τολουόλιο παίρνει ένα έντονο μωβ χρώμα ενώ στην οκτανόλη ένα ελαφρύ ροζ χρώμα. Κατασκευάστηκε οκτανολικό και τολουολικό διάλυμα συγκέντρωσης 26 και 614 ppm αντίστοιχα μέσω ανάδευσης σε μαγνητική πλάκα σε σκοτεινό δωμάτιο για μία μέρα.

### 2.2.3 Μέθοδος VALLME

Σύμφωνα με την μέθοδο VALLME 50  $\mu$ L οκτανόλης εισάχθηκαν σε 20 mL υδατικού δείγματος συγκέντρωσης 20 ppb C<sub>60</sub> (το οποίο προήλθε από αραίωση του αρχικού υδατικού αq/nC<sub>60</sub> stock διαλύματος) σε φιαλίδιο των 22 mL. Σαν αποτέλεσμα, σχηματίστηκε μια μικροσταγόνα προς οκτανόλης στην επιφάνεια του νερού. Στη συνέχεια το μίγμα καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο, septa και τέλος καπάκι. Έπειτα, έγινε ανάδευση σε συσκευή vortex για 2 min προς 2650 rpm και φυγοκεντρήθηκε (2 min, 3500 rpm) για το διαχωρισμό των δύο φάσεων και την ανάκτηση 30  $\mu$ L οκτανόλης με την βοήθεια μικροσύριγγας. Ο ανακτώμενος όγκος τοποθετήθηκε σε μικρά φιαλίδια στον αυτόματο δειγματολήπτη και από εκεί εισάχθηκε στην χρωματογραφική στήλη. Κατά την διάρκεια βελτιστοποίησης προς μεθόδου, όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

#### 2.2.4 Αναλύσεις με HPLC

Το σύστημα χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε είναι το LC 1200 Series της εταιρείας Agilent, με αντλία δύο διαλυτών, αυτόματο δειγματολήπτη, ανιχνευτή σάρωσης υπεριώδους ακτινοβολίας (UV-Diode Array Detector) και ανιχνευτή μάζας Agilent LC/MS 6110 single quadrupole detector με multimode source.

Η χρωματογραφία είναι αντίστροφης φάσης (η στατική φάση είναι λιγότερο πολική προς κινητής) με στήλη προς εταιρείας Thermo-Scientific Betasil C18, εσωτερικής διαμέτρου (ID) 2.1 mm, μήκος 10 cm, μέγεθος σωματιδίων 5  $\mu$ m και ρυθμίζεται σε θερμοκρασία 25 °C.

Η κινητή φάση είναι 40%-60% ACN-toluene, ισοκρατικό, με παροχή 0.25 mL/min και η ουσία εκλύεται στα 3.9 min. Ο αυτόματος δειγματολήπτης ήταν ρυθμισμένος ώστε να λαμβάνει τα 20 από τα 30 ανακτώμενα  $\mu$ L. Ο ανιχνευτής UV-PDA λειτουργεί στα 337 nm ενώ στον ανιχνευτή μάζας επιλέγεται τύπος λειτουργίας για αρνητικά ιόντα (negative ion mode), πολλαπλή πηγή MM-ES-APCI, fragmentor factor 220 και λόγο μάζας προς φορτίο  $m/z = 720$ .

	Τιμή	Μονάδες
Drying gas flow	5	L/min
Nebulizer pressure	35	psig
Drying gas temperature	300	°C
Vaporizer temperature	250	°C
Capillary voltage	1600	V
Corona current	4	$\mu$ A
Charging voltage	2000	V

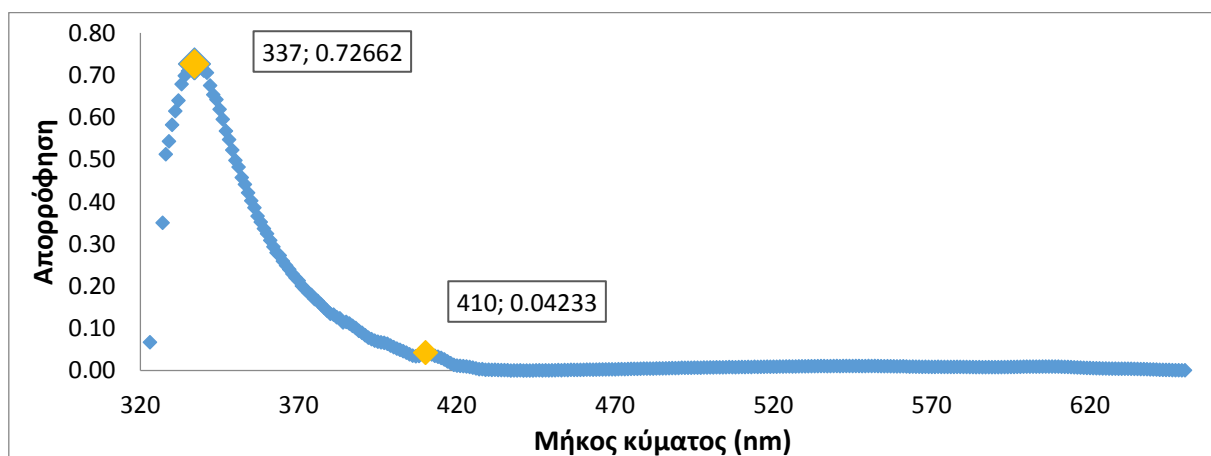
Πίνακας 2, Παράμετροι ρύθμισης του ανιχνευτή MS

### 3 Αποτελέσματα και συζήτηση

#### 3.1 Φάσματα απορρόφησης UV-Vis του $C_{60}$ σε διάφορους διαλύτες

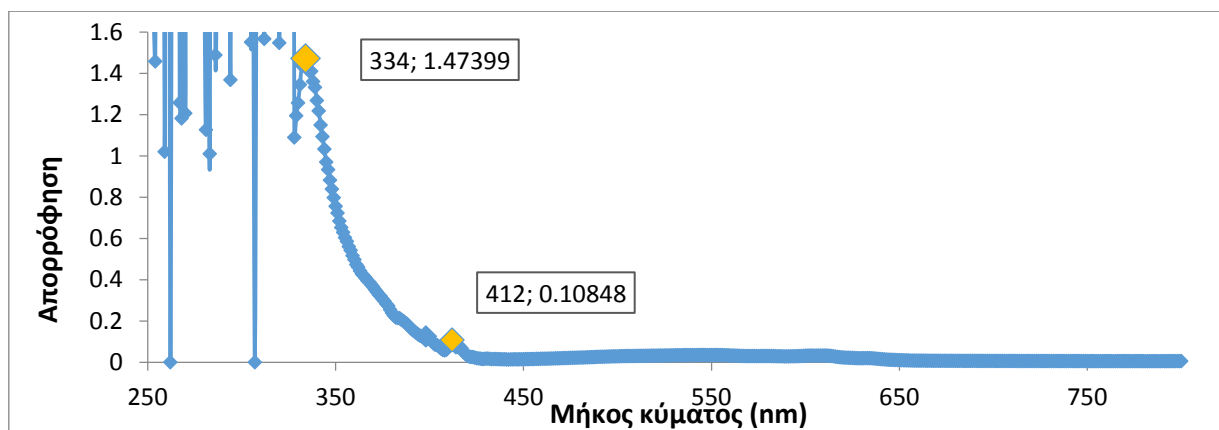
Με το φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer σε θερμοκρασία δωματίου και cuvette από χαλαζία διαμέτρου 1 cm, μετρήθηκε το φάσμα απορρόφησης του φουλλερενίου (με βήμα 1 nm) σε τρεις διαλύτες: τολουόλιο, οκτανόλη και υπερκάθαρο νερό. Λόγω των συσσωματωμάτων που δημιουργεί στο νερό, παρατηρείται ότι το φάσμα των αq/nC<sub>60</sub> είναι διαφορετικό από αυτό σε οργανικούς διαλύτες (Chang and Vikesland, 2011).

Οι τιμές για το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης του  $C_{60}$  διαφέρουν ελάχιστα από την βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, σε δημοσίευση των Χ. Chang & Ρ. Vikesland αναφέρονται κορυφές απορρόφησης του  $C_{60}$ -toluene στα 336 και 407 nm, ενώ για το αq/nC<sub>60</sub> που έχει προκύψει με την μέθοδο Extended mixing οι κορυφές απορρόφησης εντοπίζονται στα 221, 288 και 369 nm (Chang and Vikesland, 2011). Όσον αφορά το τολουολικό διάλυμα, οι κορυφές αυτές επιβεβαιώνονται, με αμελητέα διαφορά, στα 337 και 410 nm.



Εικόνα 8, Φάσμα απορρόφησης τολουολικού διαλύματος  $C_{60}$  συγκέντρωσης 10 ppm.

Μετρήσεις για την μέγιστη απορρόφηση των οκτανολικών διαλυμάτων δεν βρέθηκαν στην βιβλιογραφία, όμως βρέθηκε εργαστηριακά μέγιστη απορρόφηση στα 334 nm.



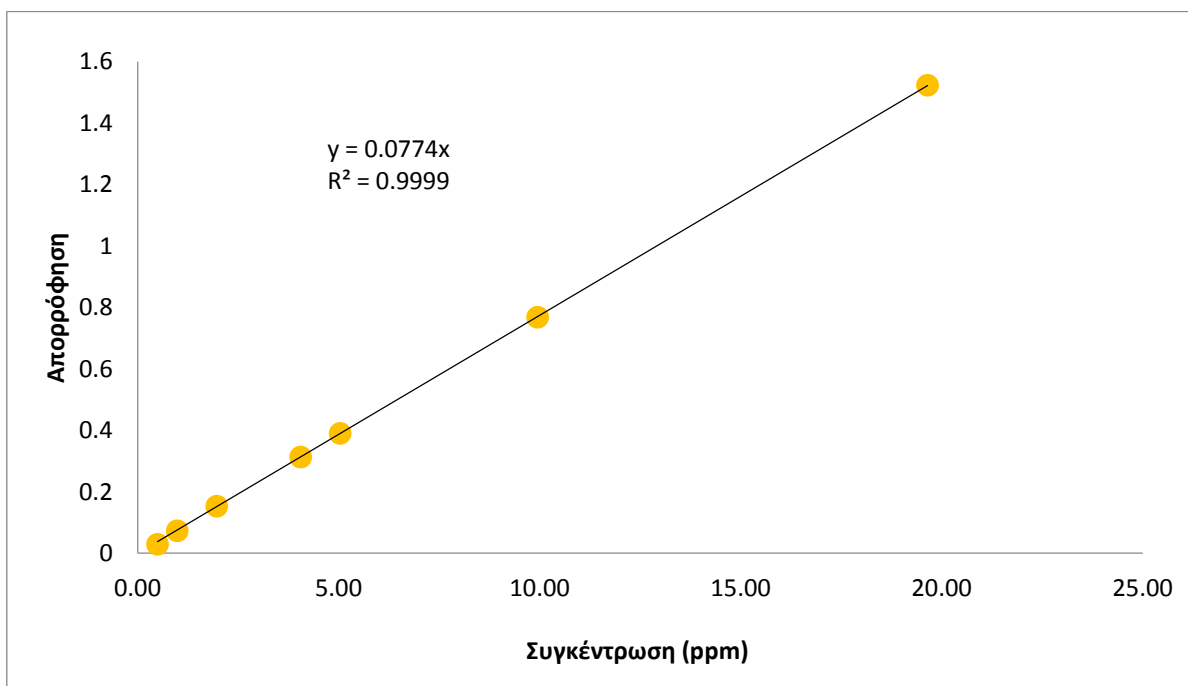
Εικόνα 9, Φάσμα απορρόφησης οκτανολικού διαλύματος  $C_{60}$  συγκέντρωσης 26 ppm.

### 3.2 Μέτρηση συγκέντρωσης aq/nC<sub>60</sub> stock διαλύματος

Επειδή η συγκέντρωση του aq/nC<sub>60</sub> διαλύματος που κατασκευάστηκε δεν είναι γνωστή, εφαρμόστηκε η τεχνική του Wang. Συγκεκριμένα, 5 ml υδατικού aq/nC<sub>60</sub> stock διαλύματος, 5 ml από διάλυμα 2% NaCl και 5 ml τολουολίου αναδεύτηκαν σε μαγνητική πλάκα για 30 min και έπειτα το μείγμα αφέθηκε για μερικά δευτερόλεπτα, μέχρι να διαχωριστεί η οργανική και η ανόργανη φάση. Από την άνω φάση του τολουολίου αφαιρέθηκε ποσότητα ώστε να γεμίσει μια κυψελίδα διαμέτρου 1 cm και έγινε μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο στα 337 nm (Wang et al., 2010). Η συγκέντρωση του τολουολικού προσδιορίστηκε από καμπύλη βαθμονόμησης C<sub>60</sub>-toluene (Διάγραμμα 4), και θεωρείται η ίδια συγκέντρωση για το υδατικό διάλυμα αφού πραγματοποιείται εκχύλιση με ίδιο όγκο φάσεων.

Η τεχνική αυτή εμπεριέχει ένα μικρό σφάλμα, διότι γίνεται η παραδοχή ότι όλη η μάζα του aq/nC<sub>60</sub> έχει μεταφερθεί από τη υδατική φάση σε αυτή του τολουολίου. Ωστόσο, δεν υπάρχει άλλη γρήγορη διαθέσιμη μεθοδολογία για τον προσδιορισμό του υδατικού nC<sub>60</sub>.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να σχολιαστεί ότι, εναλλακτικά ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του υδατικού stock θα μπορούσε να υπολογιστεί από ξήρανση και ζύγιση του φίλτρου (Chen et al., 2008). Ωστόσο, λόγω της αστάθειας των φουλερενίων, ήταν γνωστό εκ των προτέρων ότι είναι απαραίτητη η καθημερινή μέτρηση της συγκέντρωσης. Συνεπώς, για να αποφευχθεί η καθημερινή χρήση φίλτρου και αναμονή για ξήρανση, προτιμήθηκε η μέθοδος Wang (Wang et al., 2010).



Διάγραμμα 1, Καμπύλη βαθμονόμησης τολουολικών δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο στα 337 nm

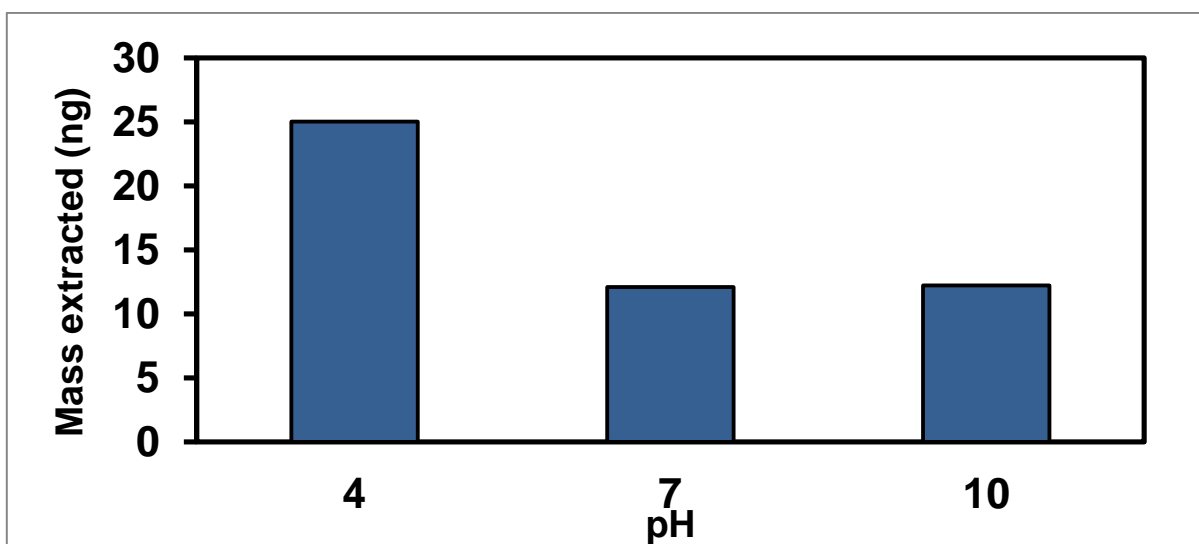
### 3.3 Βελτιστοποίηση παραμέτρων εκχύλισης

Η απρόσμενη παρουσία του αρνητικού επιφανειακού δυναμικού στα κολλοειδή υδατικά συσσωματώματα του C<sub>60</sub>, είναι ο κύριος λόγος για την σταθερότητά τους στο νερό. Παρόλο που ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται το αρνητικό φορτίο δεν είναι πλήρως κατανοητός, οι υπάρχουσες έρευνες αποδίδουν τον σχηματισμό των aq/nC<sub>60</sub> στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του C<sub>60</sub> και των μορίων του νερού.

#### Επίδραση pH

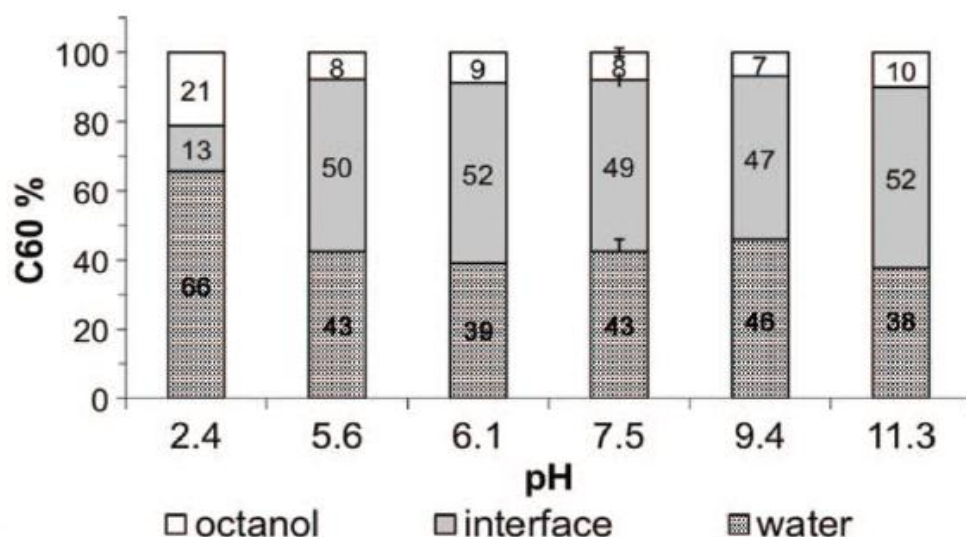
Είναι γνωστό ότι διάφοροι τύποι μικρών σωματιδίων τείνουν να συσσωρεύονται στις διεπιφάνειες υγρού-υγρού, τις οποίες και σταθεροποιούν, μειώνοντας την διεπιφανειακή ενέργεια του συστήματος (Hristovski et al., 2011), οδηγώντας έτσι, σε υψηλή σταθερότητα ορισμένων γαλακτωμάτων (Binks, 2002). Το pH και η ιοντική ισχύς είναι οι κύριες ιδιότητες των διαλυμάτων που μπορούν να διερευνηθούν, για τον έλεγχο και την αντιμετώπιση του προβλήματος της γαλακτοματοποίησης, όπως επίσης και τον καταμερισμό της ουσίας μεταξύ δύο μη αναμίξιμων φάσεων, δεδομένου ότι επηρεάζουν σημαντικά το μέγεθος και το φορτίο της επιφάνειας των κολλοειδών σε υδατικά μέσα (Wagner et al., 2014; Bouchard and Ma, 2008; Xia et al., 2006).

Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας, η VALLME εξετάστηκε ως συνάρτηση του pH και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο Διάγραμμα 2. Για την μελέτη της επίδρασης του pH χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα AcH-NaAc 0.5M. Όπως φαίνεται, η αύξηση του pH του διαλύματος από 4 σε 7 ή 10 είχε σημαντική αρνητική επίδραση στην εκχύλιση. Θεωρήθηκε ότι, η αυξημένη δραστηριότητα των πρωτονίων στο pH = 4 εξουδετερώνει τα αρνητικά φορτία στην επιφάνεια του aq/nC<sub>60</sub> και με λιγότερο ηλεκτροστατικές απώσεις στη διπλή στοιβάδα, οι ελκτικές δυνάμεις Van der Waals προκαλούν ταχεία συσσωμάτωση καθώς και διευκολύνεται ο καταμερισμός της ουσίας στα οργανικά σταγονίδια (Ma and Bouchard, 2009; Xia et al., 2006).



Διάγραμμα 2, Η επίδραση του pH στην μικροεκχύλιση

Σε ουδέτερο και υψηλό pH το αρνητικό φορτίο των συσσωματωμάτων  $nC_{60}$ , συνέβαλε στο να διατηρούνται ως σταθερά υδατικά αιωρήματα και μείωσε τον καταμερισμό τους στην φάση της οκτανόλης (Chen and Ding, 2012; Deguchi et al., 2001). Στο παρελθόν, το  $nC_{60}$  βρέθηκε να μεταβαίνει μερικώς στην φάση της οκτανόλης σε  $pH > 5,6$ , ενώ τα περισσότερα από τα  $nC_{60}$  μετέβαιναν στην διεπιφάνεια (παρά το μεγάλο αρνητικό επιφανειακό φορτίο) και στην υδατική φάση. Οι συγγραφείς συμπέραναν ότι σε υψηλές τιμές pH, ισχυρές απωστικές ενδομοριακές ηλεκτροστατικές δυνάμεις, οι οποίες προκύπτουν από πιθανή προσρόφηση ιόντων υδροξυλίου και ισχυρή ηλεκτρονιακή συγγένεια των  $nC_{60}$ , σταθεροποιούν τα συσσωματώματα αq/ $nC_{60}$ . Αντιθέτως, για τιμές pH κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο των αq/ $nC_{60}$  ( $pH_{IEP} \sim 2$ ), η μάζα του  $nC_{60}$  στην οκτανόλη περισσότερο από διπλασιάστηκε, σε σύγκριση με εκείνη που μετρήθηκε σε υψηλότερες τιμές pH, υποδεικνύοντας μειωμένη σταθεροποιητική επίδραση αυτών των ηλεκτροστατικών δυνάμεων (Hristovski et al., 2011). Με βάση τα παραπάνω, το  $pH = 4$  χρησιμοποιήθηκε για όλες τις επόμενες εκχυλίσσεις.



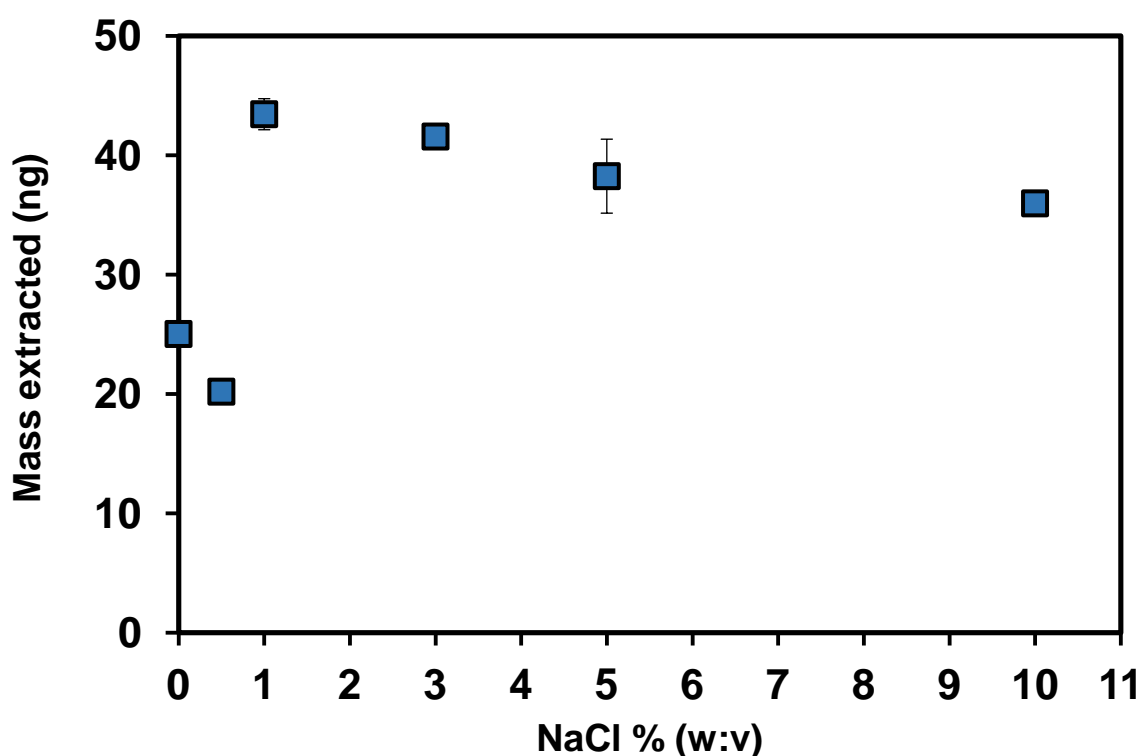
Διάγραμμα 3, Η κατανομή του  $C_{60}$  στη φάση του νερού, της οκτανόλης και στη διεπιφάνεια (Hristovski et al., 2011).

#### Επίδραση ιοντικής ισχύς

Έχει παρατηρηθεί ότι ενώ το  $C_{60}$  διαλύεται στους οργανικούς διαλύτες και ελάχιστα στο νερό, δεν ισχύει το ίδιο και για όταν βρίσκεται στην μορφή συσσωματωμάτων αq/ $nC_{60}$ . Σε αυτή τη μορφή το  $nC_{60}$  δεν θα μεταφερθεί εύκολα από το νερό στον οργανικό διαλύτη, χωρίς την παρουσία ενός οξειδωτικού μέσου ή αλατιού το οποίο διαταράσσει την σταθερότητα των κolloειδών σωματιδίων και ενισχύει τον καταμερισμό του  $nC_{60}$  σε οργανικούς διαλύτες (Bouchard and Ma, 2008; Fortner et al., 2005; Xia et al., 2006).

Συνεπώς, η ιοντική ισχύς του υδατικού διαλύματος είναι ένας επιπλέον παράγοντας που επηρεάζει το επιφανειακό φορτίο και το επιφανειακό δυναμικό (Wagner et al., 2014). Σε μια ξεχωριστή σειρά πειραμάτων βελτιστοποίησης, διερευνήθηκε η επίδραση της ιοντικής

ισχύος κατά την εκχύλιση. Κάθε φορά, 20 mL υδατικού διαλύματος aq/nC<sub>60</sub>, συγκέντρωσης 20 µg L<sup>-1</sup> σε pH = 4 και περιεκτικότητα σε αλάτι που κυμαίνεται από 0 έως 10% (w:v) NaCl, εκχυλίστηκαν χρησιμοποιώντας την μέθοδο VALLME. Όπως είναι φανερό (Διάγραμμα 4) για τιμές έως 1% (w:v) NaCl η παρουσία άλατος βοηθάει την VALLME. Επιπλέον, αύξηση της ιοντικής ισχύος, δεν προκάλεσε σημαντικές αλλαγές στην εκχύλιση, επιβεβαιώνοντας ότι υδατικές μήτρες με χαμηλή ιοντική ισχύ αρκούν για να επηρεάσουν τον καταμερισμό του aq/nC<sub>60</sub> (Hristovski et al., 2011). Σύμφωνα με προηγούμενες έρευνες, η παρουσία του αλατιού συμπιέζει περαιτέρω την ηλεκτρική διπλοστοιβάδα και προκαλεί ταχεία συσσωμάτωση των nC<sub>60</sub> βελτιώνοντας έτσι την εκχύλιση (Chen et al., 2008; Hristovski et al., 2011).



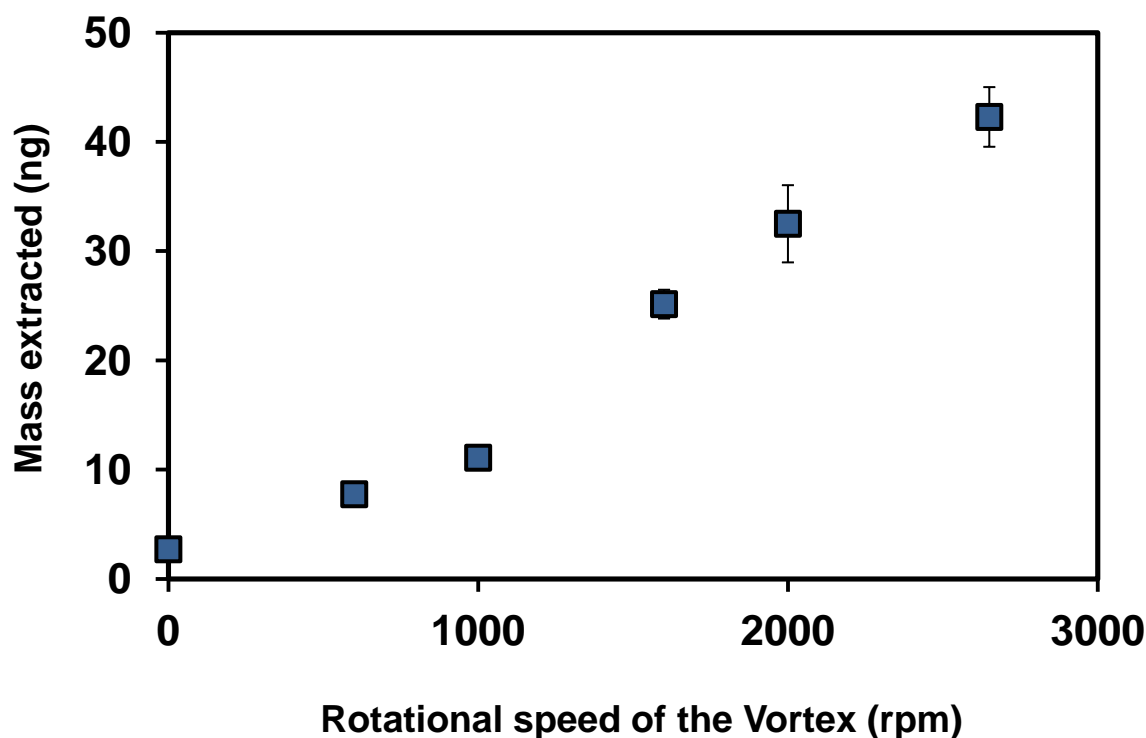
Διάγραμμα 4, Επίδραση ιοντικής ισχύος στην μικροεκχύλιση.

#### Επίδραση ταχύτητας ανάδευσης

Όταν δύο μη αναμίξιμα υγρά υποβάλλονται σε μηχανικές καταπονήσεις (πίεση, ταχύτητα ή τυρβώδεις διατμητικές τάσεις), η διεπιφάνεια παραμορφώνεται σε σημείο που σχηματίζονται σταγονίδια (Dalmazzone, 2005). Στην πραγματικότητα, η διασπορά σχηματίζεται ως αποτέλεσμα των ανταγωνιστικών επιδράσεων της διάσπασης των σταγόνων και της επανένωσή τους (Lemenand et al., 2003). Οι σταγόνες διασπώνται από δυνάμεις διάτμησης και τυρβώδεις διακυμάνσεις της πίεσης, ενώ αποκαθίστανται από την

ελαστική τάση που δημιουργείται λόγω της διεπιφανειακής τάσης. Καθώς η διάμετρος της σταγόνας μειώνεται, η τάση παραμόρφωσης επίσης μειώνεται, ενώ η τάση αποκατάστασης αυξάνεται. Η διάμετρος που τελικά επιτυγχάνεται, (αναφέρεται ως μέγιστη σταθερή διάμετρος σταγόνας), είναι στο σημείο όπου η παραμορφωτική τάση είναι ανίκανη να σπάσει την σταγόνα (Zhou and Kresta, 1998). Το μέγεθος της σταγόνας της διεσπαρμένης φάσης παίζει σημαντικό ρόλο στις διεργασίες μεταφοράς μάζας, αφού μια μείωση στην τιμή της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων, θα αυξήσει την ειδική επιφάνεια και θα επέλθει γρηγορότερα ισορροπία κατά την εκχύλιση των αναλυτών. Συνεπώς, η ταχύτητα ανάδευσης είναι μια βασική προς εξέταση παράμετρος, ενώ γρήγορη ανάδευση οδηγεί γενικά σε μικρότερες διαμέτρους σταγονιδίων (Dalmazzone, 2005).

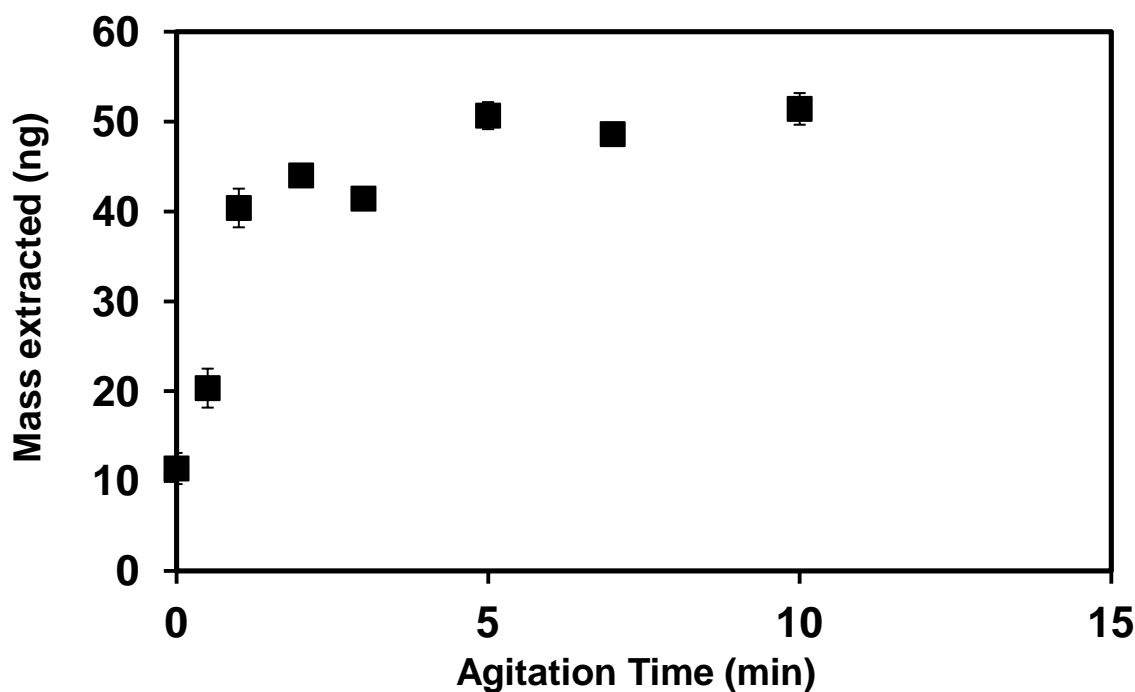
Η επίδραση της ταχύτητας περιστροφής στην ανάδευση vortex κατά την εφαρμογή της VALLME φαίνεται στο Διάγραμμα 5. Επίσης, το σημείο 0 rpm αντιστοιχούσε σε εκχύλιση μόνο λόγω διάχυσης κατά το στάδιο της φυγοκέντρωσης. Όπως αναμενόταν, αυξάνοντας την ταχύτητα ανάδευση, αυξήθηκε το ποσοστό της εκχύλισης και η βέλτιστη ταχύτητα που καταγράφηκε ήταν στα 2650 rpm (μέγιστη ρύθμιση), ενώ σε χαμηλές ταχύτητες, δεν υπήρχε ικανοποιητική δίνη για το σπάσιμο της σταγόνας και την ανάμειξη με όλο τον όγκο του υδατικού διαλύματος.



Διάγραμμα 5, Επίδραση της ταχύτητας του vortex.

### Χρόνος vortex

Η εκχύλιση είναι μια διεργασία άμεσα εξαρτώμενη από τον χρόνο. Η μέγιστη εκχύλιση επιτυγχάνεται στην ισορροπία και στόχος είναι η επίτευξή της σε λίγα λεπτά. Η ανάδευση Vortex αυξάνει την διεπιφάνεια επαφής ( $A_i$ ) και μειώνει το πάχος του στάσιμου υδατικού φιλμ ( $\delta_{aq}$ ) στη διεπαφάνεια οκτανόλης-νερού, όπως περιγράφεται στην θεωρία της διπλής διεπιφάνειας. Ως αποτέλεσμα, η VALLME επιτυγχάνει ισορροπία πάντα σε σύντομους χρόνους. Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας, εξετάστηκε ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη ισορροπίας με τη μέθοδο VALLME και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο Διάγραμμα 6. Η πειραματική τιμή 0 min αντιστοιχεί στην εκχύλιση του αναλύτη μόνο λόγω διάχυσης, κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρισης (2 λεπτά στις 3500 rpm). Όπως φαίνεται, με την μέθοδο VALLME, η ισορροπία επιτεύχθηκε σε 5 λεπτά ανάδευσης vortex. Περεταίρω αύξηση του χρόνου δεν συνεισφέρει σημαντικά στην βελτιστοποίηση της εκχύλισης, ενώ επίσης είναι επιθυμητό ο χρόνος προετοιμασίας να είναι λιγότερος από τον χρόνο ανάλυσης.



Διάγραμμα 6, Επίδραση χρόνου ανάδευσης.

### Όγκος υδατικού δείγματος

Σύμφωνα με τη θεωρία, η ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται σε ισορροπία αυξάνει με τον όγκο του δείγματος, κάτι το οποίο είναι πιο εμφανές στις ενώσεις με υψηλό  $K_{ow}$  (Papadopolou et al., 2011). Η επίδραση του όγκου του υδατικού δείγματος, διερευνήθηκε για όγκους που κυμαίνονται από 5 mL έως 20 mL, χρησιμοποιώντας το ίδιο γυάλινο

φιαλίδιο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εκχύλιση του αq/nC<sub>60</sub> ήταν περίπου 2.4 φορές μεγαλύτερη για όγκο δείγματος 20 mL σε σύγκριση με τα 5 mL. Με βάση τα παραπάνω, επιλέχθηκαν 20 ml υδατικού δείγματος για την εκχύλιση.

#### Όγκος οργανικού διαλύτη

Ο ελάχιστον όγκος οργανικού διαλύτη που μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ήταν 50 mL, από τα οποία 30 mL χρησιμοποιούνταν για την ανάλυση ενώ τα υπόλοιπα συχνά δεν ήταν ανακτήσιμα. Πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων με τιμές 50, 60, 70, και 80 mL. Όπως ήταν αναμενόμενο η απόκριση του μηχανήματος μειώθηκε με αύξηση του όγκου της σταγόνας, διότι η ίδια μάζα του φουλερενίου διαλύεται κάθε φορά σε μεγαλύτερη ποσότητα οκτανόλης που έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της συγκέντρωσης του C<sub>60</sub> στην σταγόνα.

### 3.4 Αξιολόγηση της επίδοσης της μεθόδου

Η επίδοση της προτεινόμενης μεθόδου αξιολογήθηκε έπειτα από εκχύλιση δειγμάτων στις βέλτιστες συνθήκες (50 mL οκτανόλης, 20 mL υδατικού δείγματος, pH=4, 1% w:v NaCl, 5 min ανάδευση vortex στα 2650 rpm) και φυγοκέντρωση για 2 min στα 3500 rpm. Επίσης, έγινε εφαρμογή σε μήτρα νερού βρύσης. Για μεγαλύτερη ευαισθησία, τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τον ανιχνευτή μάζας (MSD).

Η γραμμικότητα αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας πέντε τιμές συγκεντρώσεων σε εύρος 0.25 έως 5 ppb. Όλες οι τιμές εκτελέστηκαν εις διπλούν και τελικά βρέθηκε γραμμική σχέση η οποία κρίθηκε άριστη με συντελεστή συσχέτισης  $r^2 = 0.99082$ .

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου, εκφρασμένη σαν σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) ελέγχθηκε σε δύο συγκεντρώσεις, 0.5 και 2 ppb, με την εκτέλεση πέντε επαναλήψεων σε διαλύματα υπερκάθαρου νερού για κάθε συγκέντρωση, ενώ έγινε χρήση του ανιχνευτή MSD και για τις δύο συγκεντρώσεις.

Συγκέντρωση (ppb)	RSD επαναληψιμότητας (%)
0.5	7.2
2	3.0

Πίνακας 3, Αποτελέσματα ελέγχου επαναληψιμότητας μεθόδου.

Το όριο ανίχνευσης (LOD) της μεθόδου βρέθηκε με βάση την αναλογία σήματος προς θόρυβο και υπολογίστηκε 0.08 ppb. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, των μεθόδων που έχουν προταθεί μέχρι τώρα, για την ποσοτικοποίηση του C<sub>60</sub>.

Μέθοδος εκχύλισης	Μέθοδος ανάλυσης	LOQ (μg L <sup>-1</sup> )	LOD (μg L <sup>-1</sup> )	Αναφορά
VALLME	LC-APCI <sup>-</sup> -MS	0.25	0.08	Παρούσα εργασία
UA-DLLME <sup>a</sup>	LC-APPI <sup>-</sup> -MS/MS	0.06	0.04	Chen & Ding (2011)
LLE	LC-UV	2.48 <sup>b</sup>	0.746 <sup>b</sup>	Bouchard & Ma (2008)
Evaporation	LC-APPI <sup>-</sup> -MS/MS	5	2.78	Chen et.al. (2008)
LLE		10	3.33	
SPE		0.5	0.30	
LLE	LC-UV	20	3	Wang et al. (2010)
SPE	LC-MS	0.8 <sup>c</sup>	0.42-0.64 <sup>c</sup>	

Πίνακας 4, Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης για τις υπάρχουσες μεθόδους.

<sup>a</sup> Ultrasound assisted dispersive liquid liquid microextraction.

<sup>b</sup> Υγρή-υγρή εκχύλιση, εφαρμοσμένη σε υπόγεια και επιφανειακά αιωρήματα.

<sup>c</sup> Για επεξεργασμένη εκροή και έξοδο δευτεροβάθμιας επεξεργασίας λύματος.

Όπως είναι φανερό, η παρούσα μέθοδος είναι 10-40 φορές πιο ευαίσθητη από προηγούμενες προτεινόμενες μεθόδους. Αναλυτικότερα, παρουσιάζει πλεονέκτημα έναντι της SPE, αφού δεν απαιτείται διήθηση του δείγματος, και συνεπώς αποφεύγεται η συγκράτηση της εξεταζόμενης ουσίας στο φίλτρο. Επίσης, έχει ανταγωνιστικά όρια ανίχνευσης με την μέθοδο UA-DLLME, αν ληφθεί υπόψη και το είδος του ανιχνευτή που χρησιμοποιήθηκε. Ακόμα, η UA-DLLME χρησιμοποιεί έναν επιπλέον διαλύτη για την βελτίωση της διασποράς, γεγονός το οποίο αυξάνει την κατανάλωση διαλυτών, ενώ γίνεται και χρήση υπερήχων, οι οποίοι δεν είναι ξεκάθαρο ακόμα πως επιδρούν στο C<sub>60</sub>, σε αντίθεση με την ανάδευση vortex η οποία έχει χαρακτηριστεί ως μία πολύ πιο ήπια διεργασία (Yiantzi et al., 2009).

### 3.5 Εφαρμογή βέλτιστων συνθηκών σε μήτρα νερού βρύσης

Η αποτελεσματικότητα των μεθόδων μικροεκχύλισης επηρεάζονται από τη σύνθεση της μήτρας του δείγματος. Συνεπώς, δείγματα από νερό βρύσης επιμολύνθηκαν με 2 ppb stock aq/nC<sub>60</sub>, προετοιμάστηκαν υπό τις βέλτιστες συνθήκες της VALLME για τρεις επαναλήψεις και αναλύθηκαν με τον ανιχνευτή MSD. Τα αποτελέσματα ήταν ανάκτηση 90.30 % με 4.30 % RSD.

## 4 Επίλογος-Προτάσεις

Όπως διαπιστώθηκε η μέθοδος VALLME, βρίσκει επάξια εφαρμογή στην ποσοτικοποίηση του φουλερενίου  $C_{60}$ , επιτυγχάνοντας ισορροπία σε λίγα μόλις λεπτά, καταναλώνοντας μικροποσότητες οργανικού διαλύτη και έχοντας ανταγωνιστικό όριο ανίχνευσης.

Περαιτέρω χρήση αυτής της μεθόδου αναμένεται να εφαρμοστεί και σε άλλες περίπλοκες περιβαλλοντικές μήτρες, ενώ στους επόμενους στόχους περιλαμβάνονται:

- Η χρήση αυτού του εργαλείου για την μελέτη φωτοχημικών μετατροπών (κινητική και πιθανές οδούς) των φουλερενίων σε πραγματικά περιβαλλοντικά δείγματα, το οποίο είναι θέμα που μέχρι σήμερα παραμένει ανεξερεύνητο.
- Η χρήση μίας εργαστηριακής διάταξης που μιμείται την δημιουργία αεροζόλ, με στόχο την διερεύνηση παραγόντων που, και ακόμα πιο σημαντικό, να παρέχουν πληροφορίες για την επαναστατική αντίληψη, ότι τα υδατικά μέσα δεν είναι μόνιμες αποθήκες φουλερενίων, αλλά μία πηγή για παραγωγή φουλερενίων αέριας φάσης μέσω της δημιουργίας θαλάσσιου αεροζόλ.
- Διάδοση των αποτελεσμάτων μέσω επιστημονικών δημοσιεύσεων, παρουσιάσεων σε παγκόσμια συνέδρια, τεχνικές αναφορές και σεμινάρια.

## Βιβλιογραφία

- Abraham, M., Green, C., Acree, J., 2000. Correlation and prediction of the solubility of Buckminsterfullerene in organic solvents; estimation of some physicochemical properties. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*.
- Alpatova, A.L., Baumann, M.J., Davies, S.H., Masten, S.J., 2013. Evidence for covalently bonded chlorine–fullerene formed by ozonation and chlorination at room temperature. *Environmental Chemistry Letters* 11, 309–313.
- Andrievsky, G, Klochkov, V, 2005. Is the C60 fullerene molecule toxic?! ... Nanotubes.
- Andrievsky, GV, Klochkov, VK, Bordyuh, AB, 2002. Comparative analysis of two aqueous-colloidal solutions of C 60 fullerene with help of FTIR reflectance and UV–Vis spectroscopy. *Chemical Physics* ....
- Avanasi, R., Jackson, W., Sherwin, B., Mudge, J., Anderson, T., 2014. C60 fullerene soil sorption, biodegradation, and plant uptake. *Environ. Sci. Technol.* 48, 2792–7.
- Back, R, Lennox, RB, 1992. Fullerenes, C60 and C70 at the air-water interface. *The Journal of Physical Chemistry*.
- Benn, T, Cavanagh, B, Hristovski, K, 2010. The release of nanosilver from consumer products used in the home. *Journal of* ....
- Binks, B., 2002. Particles as surfactants—similarities and differences. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 7.
- Bouchard, D., Ma, X., 2008. Extraction and high-performance liquid chromatographic analysis of C60, C70, and [6,6]-phenyl C61-butyric acid methyl ester in synthetic and natural waters. *J Chromatogr A* 1203, 153–9.
- Brant, J, Lecoanet, H, Hotze, M, 2005. Comparison of electrokinetic properties of colloidal fullerenes (n-C60) formed using two procedures. *Environmental science &* ....
- Brant, JA, Labille, J, Bottero, JY, Wiesner, MR, 2006. Characterizing the impact of preparation method on fullerene cluster structure and chemistry. *Langmuir*.
- Chang, X., Vikesland, P., 2011. UV-vis spectroscopic properties of nC60 produced via extended mixing. *Environ. Sci. Technol.* 45, 99679974.
- Chen, KL, Elimelech, M, 2007. Influence of humic acid on the aggregation kinetics of fullerene (C 60) nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*.
- Chen, H.-C., Ding, W.-H., 2012. Determination of aqueous fullerene aggregates in water by ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction with liquid chromatography–atmospheric pressure photoionization–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1223, 1523.
- Chen, Z., Westerhoff, P., Herckes, P., 2008. Quantification of C60 fullerene concentrations in water. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1852–1859.
- Dalmazzone, C, 2005. The mechanical generation of emulsions. *Lubrication Science* 17, 197–237.

- Deguchi, S., Alargova, R., Tsujii, K., 2001. Stable Dispersions of Fullerenes, C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub>, in Water. Preparation and Characterization. *Langmuir* 17, 6013-6017.
- Dhawan, A., Taurozzi, J.S., Pandey, A.K., Shan, W., Miller, S.M., Hashsham, S.A., Tarabara, V.V., 2006. Stable colloidal dispersions of C<sub>60</sub> fullerenes in water: evidence for genotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7394–401.
- Donaldson, DJ, Vaida, V, 2006. The influence of organic films at the air-aqueous boundary on atmospheric processes. *Chemical reviews*.
- Farré, M, Pérez, S, Gajda-Schranz, K, Osorio, V, 2010. First determination of C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> fullerenes and N-methylfulleropyrrolidine C<sub>60</sub> on the suspended material of wastewater effluents by liquid chromatography .... *Journal of* ....
- Fortner, JD, Kim, DI, Boyd, AM, Falkner, JC, 2007. Reaction of water-stable C<sub>60</sub> aggregates with ozone. ... *science & technology*.
- Fortner, J., Lyon, D., Sayes, C., Boyd, A., Falkner, J., Hotze, E., Alemany, L., Tao, Y., Guo, W., Ausman, K., Colvin, V., Hughes, J., 2005. C<sub>60</sub> in Water: Nanocrystal Formation and Microbial Response. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4307-4316.
- Gottschalk, F, Sonderer, T, Scholz, RW, 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. ... *science & technology*.
- Heymann, 1996. Solubility of Fullerenes C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> in Seven Normal Alcohols and Their Deduced Solubility in Water. *Fullerene Science and Technology* 4, 509-515.
- Hotze, E., Labille, J., Alvarez, P., Wiesner, M., 2008. Mechanisms of photochemistry and reactive oxygen production by fullerene suspensions in water. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4175–80.
- Hou, WC, Jafvert, CT, 2008. Photochemical transformation of aqueous C<sub>60</sub> clusters in sunlight. *Environmental science & technology*.
- Hou, W.-C., Kong, L., Wepasnick, K., Zepp, R., Fairbrother, D., Jafvert, C., 2010. Photochemistry of aqueous C<sub>60</sub> clusters: wavelength dependency and product characterization. *Environ. Sci. Technol.* 44, 8121–7.
- Hristovski, K., Westerhoff, P., Posner, J., 2011. Octanol-water distribution of engineered nanomaterials. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 46, 636-647.
- Isaacson, CW, Usenko, CY, Tanguay, RL, 2007. Quantification of fullerenes by LC/ESI-MS and its application to in vivo toxicity assays. *Analytical* ....
- Isaacson, C., Kleber, M., Field, J., 2009. Quantitative Analysis of Fullerene Nanomaterials in Environmental Systems: A Critical Review. *Environ. Sci. Technol.* 43, 6463-6474.
- Jafvert, C., Kulkarni, P., 2008. Buckminsterfullerene's (C<sub>60</sub>) Octanol–Water Partition Coefficient (K<sub>ow</sub>) and Aqueous Solubility. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5945-5950.
- Klaine, S., Alvarez, P., Batley, G., Fernandes, T., Handy, R., Lyon, D., Mahendra, S., McLaughlin, M., Lead, J., 2008. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1825–1851.

- Klochkov, VK, Andrievsky, GV, 1997. Colloidal dispersions of fullerene C 60 in water: some properties and regularities of coagulation by electrolytes. *Journal of the ....*
- Kroto, HW, Heath, JR, O'Brien, SC, Curl, RF, Smalley, RE, 1985. C 60: buckminsterfullerene. *Nature*.
- Kurotobi, K, Murata, Y, 2011. A single molecule of water encapsulated in fullerene C60. *Science*.
- Lee, J, Cho, M, Fortner, JD, Hughes, JB, 2009. Transformation of aggregated C60 in the aqueous phase by UV irradiation. *Environmental science & ....*
- Lemenand, T, Valle, D.D., Zellouf, Y, 2003. Droplets formation in turbulent mixing of two immiscible fluids in a new type of static mixer. *International Journal of ....*
- Li, Q., Xie, B., Hwang, Y., Xu, Y., 2009. Kinetics of C60 fullerene dispersion in water enhanced by natural organic matter and sunlight. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3574–9.
- Ma, X., Bouchard, D., 2009. Formation of Aqueous Suspensions of Fullerenes. *Environ. Sci. Technol.* 43, 330336.
- Marcomini, A, Pojana, G, Giacometti, A, Oppo, C, 2001. Aerosolization of an anionic surfactant (LAS) and dissolved organic carbon (DOC) under laboratory conditions. *Chemosphere*.
- Murata, Y, Murata, M, Komatsu, K, 2003. 100% encapsulation of a hydrogen molecule into an open-cage fullerene derivative and gas-phase generation of H<sub>2</sub>@ C60. *Journal of the American ....*
- Obeng, YS, Bard, AJ, 1991. Langmuir films of C60 at the air-water interface. *Journal of the American Chemical Society*.
- Ojeda, B., Rojas, S., 2014. Vortex-Assisted Liquid–Liquid Microextraction (VALLME): Applications. *Chromatographia*.
- Papadopoulou, A, Román, IP, Canals, A, Tyrovolas, K, 2011. Fast screening of perfluorooctane sulfonate in water using vortex-assisted liquid–liquid microextraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytica chimica ....*
- Prylutskyy, Y., Petrenko, V., Ivankov, O., Kyzyma, O., Bulavin, L., Litsis, O., Evstigneev, M., Cherepanov, V., Naumovets, A., Ritter, U., 2014. On the origin of C<sub>60</sub> fullerene solubility in aqueous solution. *Langmuir* 30, 3967–70.
- Psillakis, E, Kalogerakis, N, 2002. Developments in single-drop microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*.
- Psillakis, E, Kalogerakis, N, 2003. Developments in liquid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*.
- Pycke, B., Halden, R., Benn, T., Westerhoff, P., Halden, R., Herckes, P., Halden, R., 2011. Strategies for quantifying C60 fullerenes in environmental and biological samples and implications for studies in environmental health and ecotoxicology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30, 4457.

- Pérez, S, Farré, M la, Barceló, D, 2009. Analysis, behavior and ecotoxicity of carbon-based nanomaterials in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*.
- Richardson, S., 2012. Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* 84, 747778.
- Sanchís, J, Berrojalbiz, N, Caballero, G, 2011. Occurrence of aerosol-bound fullerenes in the Mediterranean Sea atmosphere. ... *science & technology*.
- Sayes, CM, Fortner, JD, Guo, W, Lyon, D, Boyd, AM, 2004. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano* ....
- Shi, L., Yang, D., Colombo, F., Yu, Y., Zhang, W., Gan, L., 2013. Punching a Carbon Atom of C60 into its Own Cavity to Form an Endohedral Complex CO@ C59O6 under Mild Conditions. *Chemistry-A European Journal* 19, 16545–16549.
- Sivaraman, Dhamodaran, Kaliappan, Srinivasan, Rao, V., Mathews, 1992. Solubility of C60 in organic solvents. *J. Org. Chem.* 57, 60776079.
- Suetsuna, T, Drago, N, Harneit, W, 2002. Separation of N2@ C60 and N@ C60. ... -A *European Journal*.
- Terashima, M., Nagao, S., 2007. Solubilization of [60] fullerene in water by aquatic humic substances. *Chemistry Letters* 36, 302–303.
- Wagner, S., Gondikas, A., Neubauer, E., Hofmann, T., der Kammer, F. von, 2014. Spot the Difference: Engineered and Natural Nanoparticles in the Environment—Release, Behavior, and Fate. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53, 12398–12419.
- Wang, L, Huang, Y, Kan, AT, Tomson, MB, 2012. Enhanced transport of 2, 2', 5, 5'-polychlorinated biphenyl by Natural organic Matter (NOM) and surfactant-modified fullerene nanoparticles (n C60). ... *science & technology*.
- Wang, C., Shang, C., Westerhoff, P., 2010. Quantification of fullerene aggregate nC60 in wastewater by high-performance liquid chromatography with UV-vis spectroscopic and mass spectrometric detection. *Chemosphere* 80, 334–9.
- Wezel, A., Morinière, V., Emke, E., Laak, T., Hogenboom, A., 2011. Quantifying summed fullerene nC60 and related transformation products in water using LC LTQ Orbitrap MS and application to environmental samples. *Environ Int* 37, 1063–7.
- Wu, J, Jr, G.D., Peter, K, Benoit, D, 2014. Photo-Oxidation of Hydrogenated Fullerene (Fullerane) in Water. ... *& Technology Letters*.
- Xia, X.-R., Monteiro-Riviere, N., Riviere, J., 2006. Trace analysis of fullerenes in biological samples by simplified liquid–liquid extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1129, 216222.
- Xie, B., Xu, Z., Guo, W., Li, Q., 2008. Impact of Natural Organic Matter on the Physicochemical Properties of Aqueous C60 Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 42, 28532859.
- Yiantzi, E., Psillakis, E., Tyrovolas, K., Kalogerakis, N., 2009. Vortex-assisted liquid-liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A. *Talanta* 80, 20572062.

- Young, CJ, Furdui, VI, Franklin, J, 2007. Perfluorinated acids in arctic snow: new evidence for atmospheric formation. ... science & technology.
- Zhou, G., Kresta, S.M., 1998. Evolution of drop size distribution in liquid-liquid dispersions for various impellers. Chemical engineering science 53, 2099–2113.