

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**‘ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΥΠΟ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΕΝΟΥ’**

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΗ

ΒΟΥΛΓΑΡΗ ΚΕΡΑΣΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Αναπλ. Καθηγήτρια ΨΥΛΛΑΚΗ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ

ΜΕΛΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Καθηγητής ΚΑΛΟΓΕΡΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Δρ. ΤΥΡΟΒΟΛΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΧΑΝΙΑ (ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ, 2010)

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ελευθερία Ψυλλάκη κυρίως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση της κατά τη διάρκεια υλοποίησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Καλογεράκη Νικόλαο για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για την εξέταση της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και τη Δρ. Τυροβολά Κωνσταντίνα για την πολύτιμη βοήθεια της κατά την διεξαγωγή της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στη συμφοιτήριά μου Αρωνιάδα Γεωργία κυρίως για την ψυχολογική της υποστήριξη και στους γονείς μου, οι οποίοι στήριξαν τις σπουδές μου με διάφορους τρόπους.

Περίληψη

Οι χλωροφαινόλες είναι ενώσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως στη παραγωγή ποικίλων απολυμαντικών, καθώς και ως συστατικά για την παρασκευή βαφών, πλαστικών, δερμάτων και φυτοφαρμάκων. Λόγω της ευρείας εφαρμογής τους και του υδροφιλικού χαρακτήρα τους, έχουν ανιχνευτεί σε πολλά περιβαλλοντικά δείγματα, αφού μπορούν εύκολα να μεταφερθούν στο περιβάλλον μέσω των υδατικών μέσων. Οι χλωροφαινόλες εισέρχονται στα περιβαλλοντικά ύδατα κυρίως μέσω των λυμάτων των βιομηχανιών.

Η υψηλή τοξικότητα που παρουσιάζουν οι χλωροφαινόλες σε συνδυασμό με την συνεχή χρήση τους σε προϊόντα καθημερινής χρήσης καθιστά απαραίτητη την ανίχνευση αυτών των ουσιών στα περιβαλλοντικά δείγματα ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Γι' αυτό το λόγο είναι πολύ σημαντική η ανάπτυξη μίας μεθόδου ανίχνευσης τέτοιων ουσιών σε υδατικά περιβάλλοντα. Σ' αυτήν την διπλωματική εργασία, για πρώτη φορά ερευνάται η μέθοδος της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης των χλωροφαινολών υπό συνθήκες κενού σε πρότυπα υδατικά δείγματα. Ακόμη, εξετάζεται η βελτιστοποίηση αυτής της μεθόδου μεταβάλλοντας διάφορες παραμέτρους στην διαδικασία της μικροεκχύλισης που επηρεάζουν άμεσα την αποτελεσματικότητά της. Η ανάλυση όλων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω της αέριας χρωματογραφίας. Παρατηρήθηκε ότι η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού είναι μία πολλά υποσχόμενη τεχνική υψηλής αποδοτικότητας εκχύλισης των ημι-πτητικών χλωροφαινολών.

1

Περιεχόμενα

1	Εισαγωγή	6
1.1	Χλωροφαινόλες	6
1.1.1	Ορισμός και Χαρακτηριστικά	6
1.1.2	Χρήσεις τους	7
1.1.3	Φυσικές και Χημικές Ιδιότητες	7
1.1.4	Τοξικότητα	8
1.1.5	Επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία	9
1.2	Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (HS-SPME)	10
1.2.1	Ανάλυση μεθόδου	10
1.2.2	Πλεονεκτήματα μεθόδου	13
1.2.3	Εφαρμογές τεχνικής	14
1.2.4	Αξιολόγηση τεχνικής	15
1.3	Χρωματογραφική ανάλυση με αέρια χρωματογραφία (GC-ECD)	16
1.3.1	Εισαγωγή	16
1.3.2	Εφαρμογές της αέριας χρωματογραφίας	17
1.3.3	Διάταξη αέριου χρωματογραφου	18
1.3.4	Ανάπτυξη χρωματογραφικού διαχωρισμού	20
1.3.5	Ανιχνευτής Δέσμευσης Ηλεκτρονίων (ECD)	21
2	Πειραματικό μέρος	22
2.1	Αντιδραστήρια και Οργανολογία	22
2.2	Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων	23
2.3	Περιγραφή μεθόδου της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης	28
2.4	Περιγραφή μεθόδου της χρωματογραφικής ανάλυσης με αέρια χρωματογραφία	30
3	Αποτελέσματα και συζήτηση	32
3.1	Επιλογή του τύπου ίνας	32
3.2	Επιλογή της ταχύτητας ανάδευσης	34
3.3	Επιλογή του όγκου δείγματος	36
3.4	Επιλογή του όγκου του φιαλιδίου	38
3.5	Επιλογή pH του δείγματος	41

3.6	Επιλογή ποσότητας NaCl του δείγματος	43
3.7	Επιλογή της θερμοκρασίας και του χρόνου εκχύλισης	45
3.8	Επιλογή του χρόνου ανάδευσης	49
4	Συμπεράσματα	51
5	Μελλοντικές κατευθύνσεις	53
6	Βιβλιογραφία	54

1 Εισαγωγή

1.1 Χλωροφαινόλες

1.1.1 Ορισμός και Χαρακτηριστικά

Οι χλωροφαινόλες είναι οργανικές ενώσεις οι οποίες ανήκουν στα φαινολικά μίγματα και δημιουργούνται συνήθως κατά την επεξεργασία του πόσιμου νερού με χλώριο και γενικότερά όταν αντιδράει η φαινόλη με το χλώριο [8,18].

Οι ουσίες αυτές αποβάλλονται από τις βιομηχανίες χλωρίωσης και έχουν ως αποτέλεσμα τη ρύπανση των περιβαλλοντικών υδάτων. Γενικότερα, χλωροφαινόλη είναι οποιαδήποτε οργανοχλωριωμένη φαινόλη που περιέχει ένα ή περισσότερα άτομα χλωρίου. Οι φαινόλες είναι υδροξυπαράγωγα των αρωματικών υδρογονανθράκων και έχουν ευρεία βιομηχανική χρήση.

Οι χλωροφαινόλες χαρακτηρίζονται από σημαντική βιολογική δράση και λόγω της ισχυρής τοξικότητάς τους (καρκινογόνες, τερατογόνες κλπ.) αποτελούν τεράστιο κίνδυνο για το περιβάλλον [1]. Οι λιγότερο χλωριωμένες χλωροφαινόλες είναι περισσότερο υδρόφιλες και έτσι εύκολα μεταφέρονται μέσω των υδατικών μέσων. Οι περισσότερες χλωριωμένες μεταφέρονται δυσκολότερα, αν και συνήθως παραμένουν περισσότερο στο περιβάλλον από ότι οι λιγότερο χλωριωμένες [18]. Άλλο ένα χαρακτηριστικό τους είναι η χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, ενώ αντίθετα παρουσιάζουν υψηλή διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες. Είναι ανθεκτικές στην οξειδωση και αποικοδομούνται με την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας.

Επιπλέον, οι χλωροφαινόλες έχουν δυσάρεστη οσμή και γεύση και η ύπαρξη τους στο πόσιμο νερό γίνεται ανεπιθύμητη, εφόσον ανιχνευτούν είτε μέσω της οσμής είτε μέσω της γεύσης. Εξαιτίας της τοξικότητάς τους και της ικανότητάς τους να επηρεάσουν τη γεύση και την οσμή του νερού, η Ευρωπαϊκή Ένωση (European Union) έχει ορίσει ως μέγιστη επιτρεπτή συγκέντρωση στο πόσιμο νερό τα 0,5 μg/L, ενώ οι μεμονωμένες συγκεντρώσεις δεν πρέπει να υπερβαίνουν τα 0,1 μg/L [8].

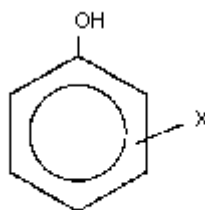
1.1.2 Χρήσεις τους

Οι χλωροφαινόλες είναι τοξικές ενώσεις για ένα ευρύ φάσμα οργανισμών και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ευρέως ως απολυμαντικά, αντισηπτικά, παρασιτοκτόνα, μυκητοκτόνα, βιοκτόνα και ζιζανιοκτόνα [1,2,8]. Μικρές ποσότητες χλωροφαινόλης, ακόμη, χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά ξύλου για την αποφυγή δημιουργίας επιφανειακής μούχλας, καθώς και ως πρόσθετα συστατικά για την αναστολή ανάπτυξης μικρόβιων σε ένα ευρύ φάσμα προϊόντων, όπως κόλλες, λάδια, κλωστοϋφαντουργικά και φαρμακευτικά προϊόντα. Πολλές φορές οι χλωροφαινόλες χρησιμοποιούνται και ως ενδιάμεσα συστατικά στην παραγωγή βαφών, πλαστικών, δερμάτων, φυτοφαρμάκων, ναρκωτικών και πολλών άλλων χημικών ενώσεων. Τέλος, ένα μικρό μέρος αυτών χρησιμοποιείται ως συστατικό σε καλλυντικά και για την παρασκευή ιατρικών παρασκευασμάτων.

1.1.3 Φυσικές και Χημικές Ιδιότητες

Οι χλωροφαινόλες αποτελούν μία ομάδα τοξικών ενώσεων με πολύ μεγάλη διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες και αντίθετα χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. Έχουν δυσάρεστη οσμή και γεύση και είναι στερεάς μορφής σε θερμοκρασία δωματίου [8]. Επίσης, είναι ημι-πτητικές ενώσεις και για αυτό μεταφέρονται εύκολα από τα μίγματα στα οποία εμπεριέχονται μέσω της ατμόσφαιρας ή εναποτίθενται υπό μορφή ιζημάτων. Τέλος, η οξύτητα τους αυξάνεται, όσο αυξάνεται ο αριθμός των ατόμων του χλωρίου.

Ο γενικός χημικός τύπος της χλωροφαινόλης δίνεται στην Εικόνα 1.



X = 1-5 chlorine atoms

Εικόνα 1: Γενικός Χημικός τύπος χλωροφαινόλης, όπου $X = 1-5$ άτομα χλωρίου [18].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιούνται για ανάλυση τρεις χλωροφαινόλες και πιο συγκεκριμένα η 2,4–Διχλωροφαινόλη, η 2,4,6–Τριχλωροφαινόλη και η 2,3,4,6–Τετραχλωροφαινόλη. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες για κάθε μία χλωροφαινόλη που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια αυτής της εργασίας.

Πίνακας 1: Φυσικοχημικές ιδιότητες των χλωροφαινολών [14].

Ιδιότητες	2,4- Διχλωροφαινόλη	2,4,6- Τριχλωροφαινόλη	2,3,4,6- Τετραχλωροφαινόλη
Αριθμός καταχώρησης	120-83-2	88-06-2	58-90-2
Μοριακός τύπος	$C_6H_4Cl_2O$	$C_6H_3Cl_3O$	$C_6H_2Cl_4O$
Μοριακό Βάρος	163,00	197,45	231,89
Διαλυτότητα στο νερό στους 25°C (mg/l)	4500	800	23
Σημείο τήξης(°C)	45	69	70
Σημείο Βρασμού(°C)	210	246	150
Τάση ατμών στους 25°C (mm Hg)	0,09	0,008	0,000666

1.1.4 Τοξικότητα

Οι χλωροφαινόλες αποτελούν μία ομάδα τοξικών ενώσεων, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προκαλέσουν καρκινογενέσεις και τερατογενέσεις σε ζωντανούς οργανισμούς, εφόσον ξεπεράσουν τις μέγιστες επιτρεπτές συγκεντρώσεις [1]. Ακόμη, χαρακτηρίζονται ως πολύ επικίνδυνες ουσίες εάν γίνει εισπνοή τους, έρθουν σε επαφή με το δέρμα ή γίνει κατάποσή τους από τον άνθρωπο. Η υψηλή τοξικότητα που παρουσιάζουν, σε συνδυασμό με τη χαμηλή βιοαποδόμηση

τους στο περιβάλλον λόγω της ανθεκτικότητας τους σ' αυτό, κατατάσσει τις χλωροφαινόλες στη λίστα με τους πιο επικίνδυνους ρυπαντές του περιβάλλοντος [8].

Η τοξικότητα των χλωροφαινολών επηρεάζεται κυρίως από τη συγκέντρωση τους και από τη φύση και τη χημική σύσταση του περιβάλλοντος στο οποίο ανιχνεύονται (την παρουσία δηλαδή άλλων χημικών ουσιών στο εσωτερικό του οργανισμού), καθώς και από τα γενετικά χαρακτηριστικά, το στάδιο ανάπτυξης και τη φυσιολογία του ατόμου.

Ο συνολικός αριθμός των ατόμων χλωρίου που έχει το μόριο μίας χλωροφαινόλης, καθώς και η θέση του χλωρίου στο φαινολικό δακτύλιο επηρεάζει σημαντικά την τοξικότητα της [2]. Τέλος, το pH επηρεάζει επίσης την τοξικότητα των χλωροφαινολών. Σε χαμηλό pH η τοξικότητα αυτών των ενώσεων αυξάνεται, ενώ με την αύξηση του pH σημειώνεται μείωση της αντίστοιχης τοξικότητάς τους [2].

Οι χλωροφαινόλες έχουν λάβει αρνητικές κριτικές κατά τις προηγούμενες δεκαετίες, εξαιτίας των επιπτώσεων που μπορεί να προκαλέσουν στο περιβάλλον λόγω της τοξικότητάς τους. Ως αποτέλεσμα αυτού ήταν ο αυστηρός περιορισμός των χρήσεων των ενώσεων αυτών σε ορισμένες χώρες, όπως στη Σουηδία και στη Φινλανδία όπου οι χλωροφαινόλες δεν χρησιμοποιούνται πλέον [18].

1.1.5 Επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία

Ο συνηθέστερος τρόπος έκθεσης του ανθρώπου στις χλωροφαινόλες είναι είτε μέσω της εισπνοής ή κατάποσής τους είτε μέσω της άμεσης επαφής με το δέρμα. Η άμεση και έντονη κατανάλωση χλωροφαινόλης μπορεί να προκαλέσει ανεπανόρθωτες βλάβες στον άνθρωπο ακόμα και το θάνατο [18]. Συγκεκριμένα, η χλωροφαινόλη μπορεί να δράσει τοξικά στον άνθρωπο εάν γίνει κατάποση της μέχρι και σχετικά μικρές δόσεις. Οι επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου είναι σοβαρότερες εάν η χλωροφαινόλη καταναλωθεί απευθείας αντί να διαλυθεί στο νερό. Οι επιπτώσεις που έχουν παρατηρηθεί σε αυτή την περίπτωση περιλαμβάνουν παθήσεις των πνευμόνων, των νεφρών, του συκωτιού, επιπτώσεις στο νευρικό σύστημα, και φυσικά σε

ορισμένες περιπτώσεις το θάνατο. Η επαφή της χλωροφαινόλης με το ανθρώπινο δέρμα οδηγεί στην άμεση προσρόφησή της από τον ανθρώπινο οργανισμό και στο θάνατο μετά από λιποθυμικό επεισόδιο σε χρονικό διάστημα από μισή ώρα μέχρι αρκετές ώρες [16]. Όσον αφορά τις επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία εξαιτίας της εισπνοής χλωροφαινόλης δεν υπάρχει ακόμη ικανοποιητικός αριθμός ερευνών. Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου η επαναλαμβανόμενη έκθεση στην χλωροφαινόλη σε χώρους εργασίας έχει προκαλέσει βλάβες στα νεφρά και στο συκώτι. Η χρόνια έκθεση έχει επίσης συσχετισθεί με προβλήματα στις αρτηρίες, το αίμα και την καρδιά. Επιπλέον, η χλωροφαινόλη δεν συμπεριλαμβάνεται στις χημικές ενώσεις που προκαλούν αρνητικές επιπτώσεις στην αναπαραγωγή και ανάπτυξη του ανθρώπου [18]. Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές σύμφωνα με τις οποίες η χλωροφαινόλη έδρασε τοξικά σε έμβρυα ζώων αλλά χωρίς να αναφέρεται ότι προκαλεί τερατογενέσεις και προβλήματα στην ανάπτυξη των ζώων. Επίσης, αρκετές έρευνες έχουν γίνει για να διαπιστωθεί εάν η χλωροφαινόλη σχετίζεται με την καρκινογένεση. Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν έχει καταστεί δυνατή η συσχέτιση της δημιουργίας καρκίνου με συγκεκριμένη ποσότητα χλωροφαινόλης [16,18].

Οι πιθανές τοξικές συνέπειες από την έκθεση σε τέτοιες ουσίες καθιστά απαραίτητη την επιβολή επιτρεπόμενων ορίων συγκέντρωσης ώστε να προστατεύεται ο ανθρώπινος οργανισμός. Για το λόγο αυτό, η Ευρωπαϊκή Ένωση (European Union) έχει ορίσει ως μέγιστη επιτρεπτή συγκέντρωση χλωροφαινόλης στο πόσιμο νερό τα 0,5 μg/L, ενώ οι μεμονωμένες συγκεντρώσεις δεν πρέπει να υπερβαίνουν τα 0,1 μg/L [8].

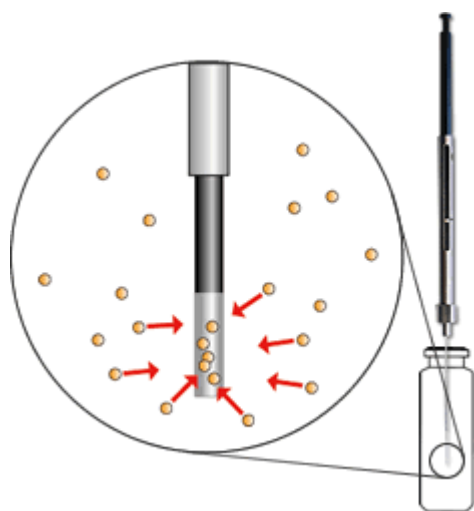
1.2 Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού

1.2.1 Ανάλυση μεθόδου

Μια νέα και απλή τεχνική προετοιμασίας δείγματος, όπου οδηγεί στην ανίχνευση των οργανικών ρύπων είναι η μέθοδος της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME). Αυτή η μέθοδος είναι γρήγορη, απλή και εξαλείφει την χρήση

τοξικών οργανικών διαλυτών, όπως απαιτείται κατά την εφαρμογή άλλων διεργασιών [10].

Η αρχή λειτουργίας της SPME βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των αναλυόμενων ουσιών του δείγματος και του υλικού επίστρωσης της ίνας μέσω της απορρόφησης και προσρόφησης (ανάλογα με την φύση του καλύμματος) [5,9,10]. Η μέθοδος της SPME χρησιμοποιείται ευρέως σε υγρά, αέρια και στερεά δείγματα και απομονώνει πτητικά και ημι-πτητικά συστατικά.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της ίνας της συσκευής SPME [3]

Η συσκευή που χρησιμοποιείται στη μέθοδο της μικροεκχύλισης SPME αποτελείται από μια τριχοειδή ίνα τετηγμένου διοξειδίου πυριτίου, μήκους 1 cm, η οποία επικαλύπτεται εξωτερικά από τη στατική φάση [3]. Η ίνα είναι συνδεδεμένη με ένα ατσάλινο έμβολο και μια συσκευή συγκράτησης που μοιάζει με μικροσύριγγα. Το δείγμα τοποθετείται σε φιαλίδιο, με διάτρητο πώμα που σφραγίζεται με διάφραγμα (septum).



Εικόνα 3: Σχηματική διάταξη της συσκευής SPME [10]

Η εισαγωγή της ίνας στο δείγμα, γίνεται τρυπώντας το διάφραγμα του δοχείου και πιέζοντας το έμβολο προς τα κάτω, οπότε εκτίθεται η ίνα στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος. Πραγματοποιείται, λοιπόν, ισορροπία κατανομής μεταξύ της στατικής φάσης της ίνας και του δείγματος.

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την απομόνωση των ουσιών είναι η στατική φάση της ίνας, η ανάδευση, η θερμοκρασία, η ιοντική ισχύς και το pH του δείγματος, καθώς επίσης και οι συνθήκες εκρόφησης της ίνας.

Στο εμπόριο κυκλοφορούν πολλοί τύποι ινών, οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους στο πάχος και στο υλικό της στατικής φάσης [5]. Η επιλογή της στατικής φάσης εξαρτάται από το είδος των προσδιοριζόμενων ουσιών [13]. Γενικά, για πολικές ουσίες χρησιμοποιούνται πολικές στατικές φάσεις, ενώ για μη πολικές ουσίες μη πολικές στατικές φάσεις. Έτσι, μια μη πολική ίνα χρησιμοποιείται για την εκχύλιση μη πολικών συστατικών, όπως είναι τα περισσότερα πτητικά αρωματικά συστατικά. Καλύτερη απομόνωση πτητικών συστατικών γίνεται με μεγαλύτερα πάχη επίστρωσης, ενώ τα λεπτότερα προορίζονται για την απομόνωση ημι-πτητικών συστατικών. Όταν χρησιμοποιούνται ίνες με μεγάλο πάχος στατικής φάσης, αυξάνεται ο χρόνος εκχύλισης, αφού αυξάνεται και ο χρόνος αποκατάστασης της ισορροπίας. Ταυτόχρονα όμως αυξάνεται και η ευαισθησία της ανάλυσης, καθώς εκχυλίζεται μεγαλύτερη μάζα δείγματος.

Υπάρχουν δύο τύποι δειγματοληψίας SPME: η βυθιζόμενη δειγματοληψία (direct immersion sampling) και η δειγματοληψία υπερκείμενης φάσης (headspace sampling) [2,5].

Κατά την βυθιζόμενη δειγματοληψία, η ίνα βυθίζεται εντός του υδατικού διαλύματος και οι αναλυόμενες ουσίες αποσπώνται και προσκολλώνται πάνω στην ίνα. Για την επίτευξη γρηγορότερης εκχύλισης απαιτείται ανάδευση του δείγματος. Για αέρια δείγματα, οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι η φυσική μεταγωγή του αέρα. Για υδατικά δείγματα, η αύξηση της ροής του δείγματος και η ανάδευση του διαλύματος με μαγνήτη ή με χρήση υπέρηχων είναι αποτελεσματικές τεχνικές για την ταχύτερη εκχύλιση.

Στην δειγματοληψία υπερκείμενης φάσης, οι αναλυόμενες ουσίες πρέπει να μεταφερθούν στην ίνα μέσω του υπερκείμενου αέρα. Με αυτόν τον τρόπο, προστατεύεται η ίνα από τη φθορά από μεγάλου μοριακού βάρους ενώσεις και άλλες μη πολικές ουσίες που τυχόν παρεμβαίνουν στο δείγμα, όπως χουμικές ενώσεις. Με αυτή την διεργασία, είναι επιτρεπτές τροποποιήσεις του δείγματος, όπως αλλαγή του pH, χωρίς να φθείρεται η ίνα, εφόσον δεν έρχεται σε άμεση επαφή με το διάλυμα. Η μέθοδος αυτή επιλέγεται συνήθως για πολύ πτητικές ενώσεις, οι οποίες εξατμίζονται πολύ γρήγορα και έτσι βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στον υπερκείμενο αέρα και όχι μέσα στο δείγμα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μικροεκχύλισης SPME υπό συνθήκες κενού με δειγματοληψία στην υπερκείμενη φάση. Μετά τον διαχωρισμό των αναλυόμενων ουσιών από την μήτρα του δείγματος και την απορρόφηση τους από την ίνα και έπειτα από ένα καλά καθορισμένο χρονικό διάστημα, η ίνα μεταφέρεται σε σύστημα χρωματογραφίας για ανάλυση.

1.2.2 Πλεονεκτήματα μεθόδου

Η μέθοδος της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις άλλες μεθόδους εκχύλισης οργανικών ρύπων. Ένα από αυτά είναι ότι η δειγματοληψία είναι γρήγορη και απλή και πραγματοποιείται χωρίς τη χρήση τοξικών οργανικών διαλυτών, καθώς και ότι τα όρια ανίχνευσης μπορεί να φτάσουν σε πολύ χαμηλά

επίπεδα (ppt) [5,6]. Η μέθοδος SPME έχει, επίσης, μεγάλες δυνατότητες για χρήση στο πεδίο. Είναι δυνατή η επί τόπου δειγματοληψία, που μπορεί να γίνει ακόμα και από μη επιστήμονες, χωρίς την ανάγκη να υπάρχει αέριος χρωματογράφος σε κάθε θέση. Αυτό συμβαίνει διότι όταν αποθηκεύονται σωστά τα δείγματα, μπορούν να αναλυθούν ημέρες αργότερα στο εργαστήριο χωρίς να παρουσιαστεί σημαντική απώλεια των πτητικών ουσιών. Ακόμη, η μέθοδος αυτή μειώνει το χρόνο που απαιτείται για την προετοιμασία του δείγματος, μειώνει το κόστος αγοράς και διάθεσης των διαλυτών και μπορεί να βελτιώσει σημαντικά τα όρια ανίχνευσης. Η απουσία του διαλύτη είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό, δεδομένου ότι δεν είναι μόνο φιλική προς το περιβάλλον, αλλά καθιστά το διαχωρισμό γρηγορότερο, γεγονός που αυξάνει το ρυθμό απόδοσης και επιτρέπει τη χρήση των απλούστερων μέσων. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό της SPME είναι το μικρό μέγεθός του, που είναι βολικό για τις εργασίες στους αγρούς και γενικότερα στο πεδίο. Τέλος, με τη SPME ελαχιστοποιούνται τα σφάλματα που οφείλονται στο κακό χειρισμό των δειγμάτων [4].

Συνοπτικά, η μέθοδος SPME συνδυάζει τη δειγματοληψία, την απομόνωση και τον εμπλουτισμό σε ένα μόνο βήμα και μεταφέρει άμεσα τις ουσίες σε αέρια ή υγρή χρωματογραφία για ανάλυση, περιορίζοντας με αυτόν τον τρόπο τις απώλειες των αναλυόμενων ουσιών που προκύπτουν από πιο πολύπλοκες διεργασίες.

1.2.3 Εφαρμογές τεχνικής

Η μέθοδος της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης βρίσκει πολλές εφαρμογές και χρησιμοποιείται ως αναλυτικό εργαλείο για την ανίχνευση ρύπων σε ποικίλες μήτρες. Παρουσιάζει ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών, που περιλαμβάνει το περιβάλλον, τη βιομηχανική υγιεινή, την ιατρική και ιατροδικαστική επιστήμη, την βιομηχανία τροφίμων, καθώς και την ανάλυση των ναρκωτικών [3,6]. Μέχρι στιγμής, η μέθοδος SPME έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως στην περιβαλλοντική ανάλυση με επίκεντρο τις υδατικές μήτρες προκειμένου να ελεγχθεί η ύπαρξη ρύπων στο νερό. Επίσης, τα τελευταία χρόνια, η μέθοδος SPME είναι ευρέως αποδεκτή τεχνική για ανάλυση στη βιομηχανία τροφίμων,

ιδίως στο τομέα γεύση και άρωμα. Απλοποιεί όχι μόνο τη διαδικασία έλεγχου της καθαρότητας των προϊόντων αυτών, αλλά και το χαρακτηρισμό του βέλτιστου χρόνου της συγκομιδής. Σε κλινικές εφαρμογές, η μέθοδος SPME έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των καταλοίπων των ναρκωτικών στο αίμα, στα ούρα και σε άλλα σωματικά υγρά.

Τέλος, η μέθοδος SPME έχει εφαρμοστεί επιτυχώς για ανάλυση σε συνδυασμό με αέρια χρωματογραφία, υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία, τριχοειδής ηλεκτροφόρηση και φασματομετρία μάζας [1,9,10]. Το σύνολο των χημικών ενώσεων που μπορούν να αναλυθούν χρησιμοποιώντας τη τεχνική μικροεκχύλισης SPME περιλαμβάνει πτητικές, ημι-πτητικές και ακόμη και μη πτητικές οργανικές και ανόργανες ουσίες.

1.2.4 Αξιολόγηση τεχνικής

Η μέθοδος της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης είναι μία τεχνική εκχύλισης που προτάθηκε τα τελευταία χρόνια για την ανάλυση των ιχνών των οργανικών ουσιών και παρουσιάζει πλεονεκτήματα σε σχέση με πιο συμβατικές μεθόδους εκχύλισης [4]. Είναι μία γρήγορη και απλή μέθοδος στη χρήση και εξαλείφει τη χρήση τοξικών οργανικών διαλυτών, γεγονός που ελαχιστοποιεί το κόστος της αγοράς υψηλής καθαρότητας διαλυτών κατά τη διαδικασία της προετοιμασίας του δείγματος [5,6]. Επίσης, η μέθοδος SPME δεν απαιτεί μεγάλο όγκο δειγμάτων, καθώς ένα όγκος από 1-5 ml είναι επαρκής για δειγματοληψία και ανάλυση. Τέλος, μπορεί να μειώσει σημαντικά το χρόνο που απαιτείται για την ανάλυση συνδυάζοντας τη δειγματοληψία, την απομόνωση και τον εμπλουτισμό του δείγματος σε μία ενιαία διαδικασία. Η διαδικασία αυτή έχει δύο στάδια: τη στεγανοποίηση των αναλυτών μεταξύ της μήτρας και μία στατική φάση, το οποίο είναι επικαλυμμένο από τετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου, καθώς και την άμεση εκρόφηση των παγιδευμένων ουσιών στο όργανο της ανάλυσης, περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο τις απώλειες των αναλυόμενων ουσιών που προκύπτουν από πιο πολύπλοκες διεργασίες.

1.3 Χρωματογραφική ανάλυση με αέρια χρωματογραφία (GC-ECD)

1.3.1 Εισαγωγή

Η αέρια χρωματογραφία αναπτύχθηκε ως αναλυτική τεχνική τα τελευταία σαράντα χρόνια [16]. Η τεχνική αυτή είναι σχετικά απλή και χρησιμοποιείται για την ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα, προϊόντα πετρελαίου κλπ.

Στην αέρια χρωματογραφία, η κινητή φάση είναι ένας μεταφορέας αερίου, συνήθως ένα αδρανές αέριο όπως το ήλιο ή χημικά αδρανές αέριο, όπως το άζωτο. Η φάση αυτή δεν επιδρά με τα μόρια του αναλυτή, αλλά ο μόνος ρόλος της είναι η διακίνηση του αναλυτή κατά μήκος της στήλης. Η στατική φάση είναι ένα μικροσκοπικό στρώμα του υγρού ή πολυμερές σε αδρανή στερεά που ονομάζεται στήλη. Το όργανο που χρησιμοποιείται στην αέρια χρωματογραφία ονομάζεται χρωματογράφος αέριας φάσης. Οι αέριες ενώσεις που αναλύονται αλληλεπιδρούν με τα τείχη της στήλης, τα οποία είναι επικαλυμμένα με διαφορετικές στατικές φάσεις. Αυτό προκαλεί κάθε ένωση να εκλύεται σε διαφορετική χρονική στιγμή, γνωστό ως ο χρόνος κατακράτησης της ένωσης. Η σύγκριση των χρόνων κατακράτησης είναι αυτό που δίνει στον αέριο χρωματογράφο την αναλυτική χρησιμότητά του.

Η αέρια χρωματογραφία παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα σχετικά με άλλες αναλυτικές μεθόδους. Πρώτα απ' όλα, απαιτεί μικρού μεγέθους δείγματα τα οποία δεν χρειάζονται εκτεταμένη προεργασία και είναι αποτελεσματική στο διαχωρισμό πολύπλοκων μιγμάτων στα επιμέρους συστατικά τους. Τα αποτελέσματα αυτής της τεχνικής λαμβάνονται σε σύντομο χρονικό διάστημα και υψηλή ακρίβεια (1-5% RSD). Ακόμη, ο αέριος χρωματογράφος παρουσιάζει την κατάλληλη ευαισθησία για τον προσδιορισμό πτητικών οργανικών ενώσεων σε χαμηλές συγκεντρώσεις (ppb, ppt) και η οργανολογία του δεν είναι περίπλοκη. Τέλος, η αέρια χρωματογραφία ως αναλυτική μέθοδος είναι ακατάλληλη για θερμικά ασταθείς ενώσεις και τα δείγματα που αναλύονται θα πρέπει να είναι διαλυτά και να μην αντιδρούν με τη στήλη.

Ποιοτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου χρωματογραφικής ανάλυσης με αέρια χρωματογραφία (GC-ECD)

Μια από τις πλέον επιθυμητές ιδιότητες ενός αναλυτικού οργάνου, είναι η ικανότητα διάκρισης της πραγματικής τιμής της ποσότητας μέσα από ανεπιθύμητα σήματα.

Σήμα (signal): είναι ο φορέας στον οποίο κωδικοποιείται η ζητούμενη πληροφορία κατά τη διαδικασία μιας μέτρησης.

Θόρυβος (noise): είναι το σύνολο των ανεπιθύμητων πληροφοριών, οι οποίες συνοδεύουν το σήμα και υποβαθμίζουν την ορθότητα και την ακρίβεια μιας μέτρησης.

Επαναληψιμότητα (repeatability): δηλώνει την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων μιας σειράς πειραμάτων που διεξάγονται από τον ίδιο αναλυτή, στο ίδιο όργανο, με τα ίδια αντιδραστήρια και στη διάρκεια της ίδιας ημέρας (intra-day repeatability).

«RSD» : Σχετική τυπική απόκλιση, υπολογιζόμενη με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν υπό συνθήκες επαναληψιμότητας [(τυπική απόκλιση (standard deviation) / μέση τιμή (average)) × 100].

1.3.2 Εφαρμογές της Αέριας χρωματογραφίας

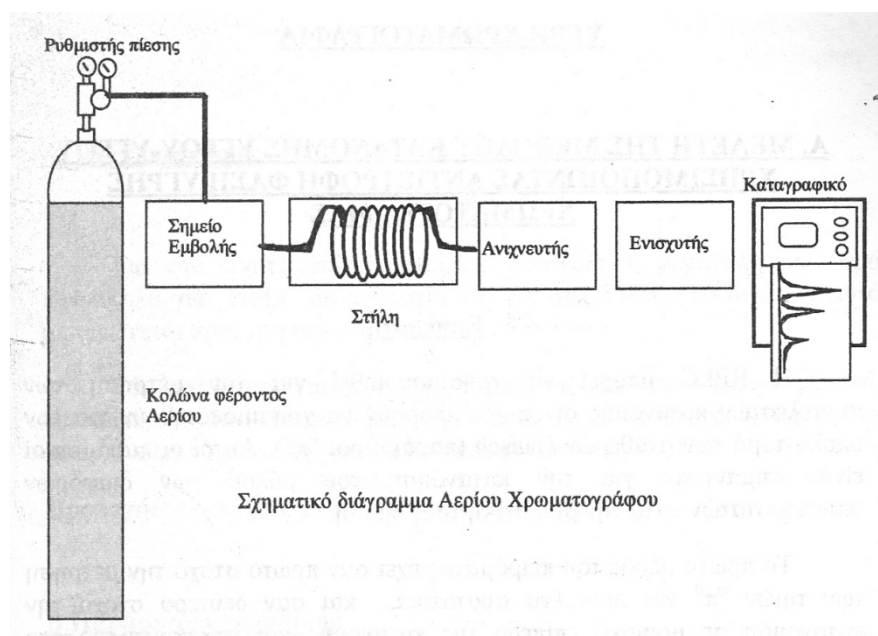
Η αέρια χρωματογραφία είναι μία μέθοδος ανάλυσης με ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών. Πρώτη και κύρια της χρήση είναι ο διαχωρισμός και η ανάλυση των πολλαπλών στοιχείων σε ένα μίγμα, όπως αιθέρια έλαια, υδρογονάνθρακες και διαλύτες [7,16,17]. Εγγενώς, με τη χρήση του ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων, που έχει πολύ υψηλή ευαισθησία, η αέρια χρωματογραφία μπορεί να προσδιορίσει ποσοτικά τα υλικά που υπάρχουν σε

πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Κατά συνέπεια, ο δεύτερος πιο σημαντικός τομέας είναι η εφαρμογή σε μελέτες ρύπανσης, εγκληματολογικές έρευνες και γενικά ιχνοανάλυση.

Γενικότερα, η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων. Τυπικές χρήσεις του αέριου χρωματογράφου περιλαμβάνουν τον έλεγχο της καθαρότητας της συγκεκριμένης ουσίας ή το διαχωρισμό των διαφόρων συνιστωσών του μίγματος, καθώς και το καθορισμό των σχετικών ποσών των εν λόγω στοιχείων.

1.3.3 Διάταξη αέριου χρωματογράφου

Τα βασικά μέρη ενός αέριου χρωματογράφου είναι το φέρον αέριο, ο ρυθμιστής πίεσης του φέροντος αερίου, το σύστημα εισαγωγής δείγματος, η στήλη, ο ανιχνευτής, ο ενισχυτής σήματος και ο καταγραφέας. Στην Εικόνα 4 φαίνεται σχηματικά η διάταξη ενός αέριου χρωματογράφου.



Εικόνα 4: Σχηματικό διάγραμμα Αέριου Χρωματογράφου [16]

Το φέρον αέριο (συνήθως N_2 , He, H_2 , Ar) από τη φιάλη υψηλής πίεσης, μέσα από ρυθμιστές παροχής, οδηγείται στη στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος

γίνεται στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στη κορυφή της στήλης. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης και διαχωρίζονται. Τα κλάσματα, στη συνέχεια, ανιχνεύονται στον ανιχνευτή και τα σήματα ανίχνευσης καταγράφονται από το καταγραφικό σύστημα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, στη συνέχεια υπάρχει μία διάταξη, όπου συλλέγονται τα διάφορα κλάσματα και ένα ροόμετρο για τον έλεγχο της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου.

Ως φέρον αέριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αέριο σε υπερκάθαρη κατάσταση, το οποίο μπορεί να διαφοροποιηθεί στον ανιχνευτή, από τα διάφορα συστατικά του μίγματος. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι χημικώς αδρανές και απαλλαγμένο από προσμίξεις. Επίσης, δεν πρέπει να περιέχει οξυγόνο, γιατί οξειδώνει τη στατική φάση και αυτό σημαίνει καταστροφή της στήλης, ιδιαίτερα όταν αυτή είναι τριχοειδής και η ποσότητα της στατικής φάσης είναι ελάχιστη. Ίχνη υγρασίας απενεργοποιούν τη στατική φάση, γι' αυτό το φέρον αέριο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από υγρασία. Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται κυρίως από τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται.

Το σπουδαιότερο τμήμα του αερίου χρωματογράφου είναι η στήλη όπου και γίνεται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος. Υπάρχουν δύο είδη στηλών: οι πληρωμένες στήλες και οι τριχοειδείς. Η στήλη αποτελείται από έναν επιμήκη σωλήνα, συνήθως με τη μορφή σπειράματος ή U, ώστε να καταλαμβάνει κατά το δυνατόν μικρότερο χώρο και είναι κατασκευασμένος από ανοξείδωτο χάλυβα, χαλκό, αργίλιο, ύαλο ή πλαστικό. Το δείγμα εισάγεται στο ρεύμα του φέροντος αερίου στην αρχή της στήλης, διαμέσου μιας ελαστικής πλακέτας ή διαφράγματος. Η ταχύτητα και η ικανότητα του χρωματογραφικού διαχωρισμού εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Για αυτό το λόγο η στήλη βρίσκεται σε φούρνο, του οποίου η θερμοκρασία ελέγχεται αυστηρά.

Το δεύτερο μέρος του χρωματογράφου περιλαμβάνει τον ανιχνευτή, ο οποίος τοποθετείται στο τέλος της στήλης. Τα σήματα ενισχύονται και καταγράφονται στο καταγραφικό σύστημα. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται σε ένα αέριο χρωματογράφο, είναι κυρίως οι εξής: ανιχνευτής φλόγας (flame ionization detector, FID), ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (thermal conductivity detector, TCD) και ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (electron capture

detector, ECD). Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων ECD, καθώς είναι ένας από τους ευρύτερα χρησιμοποιημένους ανιχνευτές για περιβαλλοντικά δείγματα, λόγω της εκλεκτικότητας του προς αλογονούχες ενώσεις.

1.3.4 Ανάπτυξη χρωματογραφικού διαχωρισμού

Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφόρων δυνάμεων συγκράτησης και έκλουσης ανάμεσα στα συστατικά του μίγματος, το υλικό πλήρωσης της στήλης και της ροής του φέροντος αερίου [7,16]. Ο διαχωρισμός δύο ουσιών σε ένα μίγμα στην αέρια χρωματογραφία βασίζεται στην κατανομή των ουσιών μεταξύ των δύο φάσεων, της στατικής και της κινητής. Δύο ουσίες A και B έχουν διαφορετική συγγένεια για τη στατική φάση της στήλης και επομένως κατανέμονται μεταξύ των δύο φάσεων με διαφορετικούς λόγους. Η κατανομή αυτή των συστατικών μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης είναι μια διαδικασία ισορροπίας η οποία περιγράφεται από τον συντελεστή κατανομής K που ορίζεται από τον λόγο του στοιχείου στη στατική προς τη φέρουσα φάση:

$$K_A = \frac{C_s}{C_m}$$

όπου C_s η συγκέντρωση της ουσίας στη στατική φάση και C_m η συγκέντρωση της ουσίας στην κινητή φάση.

Αν μία ουσία A έχει μεγαλύτερο συντελεστή κατανομής K από μία άλλη ουσία B τότε η πρώτη ουσία θα βρίσκεται περισσότερο χρόνο στη στατική φάση ανά πάσα στιγμή και επομένως θα κάνει περισσότερο χρόνο από την B να βγει από την στήλη.

Το φέρον αέριο αποτελεί την κινητή φάση και πρέπει να είναι χημικά αδρανές έναντι του υλικού κατασκευής του αερίου χρωματογράφου, του πληρωτικού υλικού της στήλης και των διαχωριζόμενων ουσιών. Η επιλογή του φέροντος αερίου γίνεται συνήθως με βάση τον τύπο του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή γιατί το φέρον αέριο πρέπει να διαφέρει από τις διαχωριζόμενες ουσίες ως προς μία ιδιότητα π.χ. θερμική αγωγιμότητα, πυκνότητα κ.τ.λ. στην οποία βασίζεται η λειτουργία του ανιχνευτή.

Ο χρόνος που χρειάζεται για την έξοδο της ουσίας A από τη στήλη μετρούμενος από τη στιγμή της εμβολής ονομάζεται χρόνος εμφάνισης του A και είναι σταθερός για κάθε ουσία κάτω από σταθερές συνθήκες. Όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος που η ουσία παραμένει μέσα στην κολώνα τόσο πλατύτερη είναι η καμπύλη που παίρνουμε.

1.3.5 Ανιχνευτής Δέσμευσης Ηλεκτρονίων (ECD)

Ο Ανιχνευτής Δέσμευσης Ηλεκτρονίων (ECD) είναι ο πλέον ευαίσθητος ανιχνευτής στην αέρια χρωματογραφία. Ο ανιχνευτής αυτός είναι ένας θάλαμος ιονισμού. Στηρίζεται στην αρχή ότι η αγωγιμότητα των αερίων στο θάλαμο μεταβάλλεται από την παρουσία ενός αερίου που μολύνει τα παραπάνω αέρια [16,17]. Στον ανιχνευτή αυτόν υπάρχει ένα ηλεκτρόνιο στην επιφάνεια του οποίου βρίσκεται ένα ραδιοϊσότοπο που εκπέμπει υψηλής ενέργειας ηλεκτρόνια (β-σωματίδια). Ένα ηλεκτρόνιο από τη ραδιενεργό πηγή προκαλεί ιοντισμό του φέροντος αερίου και έτσι δημιουργείται πλάσμα θετικών ιόντων, ριζών και θερμοηλεκτρονίων. Η παρουσία ουσιών, που εκκλύονται από τη στήλη, δεσμεύουν ηλεκτρόνια και έτσι τροποποιείται το ρεύμα που δημιουργείται με αποτέλεσμα την ανίχνευσή τους. Το ρεύμα του αερίου μαζί με τα διαχωριζόμενα συστατικά εξέρχεται από τη στήλη και περνάει στον ανιχνευτή. Όταν περνάει μόνο φέρον αέριο το ηλεκτρικό σήμα του ανιχνευτή είναι σταθερό. Όταν περνάει κάποια ουσία παράγεται διαφορετικό ηλεκτρικό σήμα. Το οπτικό αποτέλεσμα είναι το χρωματογράφημα.

Ο Ανιχνευτής Δέσμευσης Ηλεκτρονίων περιλαμβάνει ηλεκτρονικό έλεγχο των αερίων καύσης και είναι κατάλληλος για οργανοχλωριωμένες ενώσεις και PCBs. Ακόμη, παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία και έχει σύστημα προστασίας του περιβάλλοντος από μόλυνση.

Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται ορισμένα χαρακτηριστικά του ανιχνευτή δέσμευσης ηλεκτρονίων ECD.

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων [16]

Χαρακτηριστικό	Τιμή
Πηγή ακτινοβολίας ⁶³ Ni	370 Mbq
Εύρος θερμοκρασίας	25°C-450°C με βήματα 1°C
Όριο ανίχνευσης	10fg Lindane
Γραμμικότητα	>10 ⁴ μέγεθος

2 Πειραματικό μέρος

2.1 Αντιδραστήρια και Οργανολογία

Τα αντιδραστήρια και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων είναι τα ακόλουθα:

- ❖ 2,4–Διχλωροφαινόλη (Fluka, Riedel de Haën, Seelze, Germany),
2,4,6–Τριχλωροφαινόλη και 2,3,4,6–Τετραχλωροφαινόλη (Supelco, Bellefonte, USA)
- ❖ Ακετόνη (Fluka, Riedel de Haën, Seelze, Germany) με πυκνότητα 0,7925 gr/mL
- ❖ Γυάλινα φιαλίδια των 7 ml (Supelco, Bellefonte, USA)
- ❖ Γυάλινα φιαλίδια των 15 ml (Supelco, Bellefonte, USA screw cap Vials with Black Viton® septa)
- ❖ Gas sampling Pumps σε τέσσερις διαφορετικούς όγκους (125ml, 250ml, 500ml και 1000ml) (Supelco, Bellefonte, USA)
- ❖ Αναδευτήρας τύπου vortex (Reax Control, Heidolph, Germany)
- ❖ Ίνες μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) (Supelco, Bellefonte, USA)
- ❖ Σύριγγα 10 μl Hamilton Gastight (Hamilton Bonaduz, NEVADA), Model 170SNR με αμβλεία βελόνα

- ❖ Σύριγγα 10 ml Hamilton Gastight (Hamilton Bonaduz, NEVADA), Model 170SNR με αμβλεία βελόνα
- ❖ Σύστημα GC-ECD: Shimadzu GC-17A (version 3)-ECD (version 2), με σύστημα εισαγωγής split/splitless
- ❖ He (>99.99% pure) ως φέρον αέριο στο GC πίεσης 96 kPa
- ❖ Λογισμικό συστήματος GC-ECD: Shimadzu Class-VP Chromatographic Data System (Version 4.3)
- ❖ Τριχοειδής στήλη HP5-MS, 30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 μm
- ❖ Ελαστικό πώμα για το GC και τις Gas sampling Pumps, Thermogreen LB-2 (Supelco)
- ❖ Αντλία κενού αέρα
- ❖ Υπερκάθαρο νερό, από το σύστημα EASYPURE RF της Barnstead/Thermolyne

2.2 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

ο Παρασκευή διαλυμάτων σε ακετόνη

Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων επιλέχθηκε ως καταλληλότερος διαλύτης η ακετόνη, καθώς οι ουσίες μας είναι διαλυτές σε αυτή. Αρχικά, έγινε η παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων κάθε μιας από τις εξεταζόμενες ουσίες σε ακετόνη με συγκεντρώσεις 7296,3 ppm για τη 2,4-Διχλωροφαινόλη, με 7414,3 ppm για τη 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 7107,9 ppm για τη 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη αντίστοιχα. Παρακάτω παρουσιάζεται αναλυτικά η διαδικασία η οποία ακολουθήθηκε για την κάθε ουσία ξεχωριστά:

Παρασκευή πυκνού διαλύματος 2,4-Διχλωροφαινόλης με συγκέντρωση C = 7296,3 ppm:

Σε ογκομετρική φιάλη των 5 ml ζυγίζονται σε ζυγαριά ακριβείας και εισάγονται περίπου 36,2 mg της διαλυμένης ουσίας. Στη συνέχεια, προστίθεται περίπου 5 ml ακετόνης (έως της σχισμή της φιάλης) και το διάλυμα ξαναζυγίζεται. Η τελική τιμή που παίρνουμε είναι αυτή που θα χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ουσίας στο διάλυμα ακετόνης. Έχοντας υπολογίσει τη μάζα της διαλυμένης ουσίας (36,2mg) στην αρχή και τη μάζα του διαλύματος (3968,1mg) μετά την προσθήκη της ακετόνης, μπορεί να υπολογιστεί η μάζα μόνο του διαλύτη που ισούται με $(3968,1 - 36,2) = 3931,9$ mg = 3,9319 g. Στη συνέχεια, γνωρίζοντας την πυκνότητα της ακετόνης και την αντίστοιχη μάζα της υπολογίζεται ο όγκος της ακετόνης με τον εξής τρόπο: $V = m/\rho = 3,9319 \text{ g}/0,7925 \text{ g/mL} = 4,96 \text{ mL}$, δηλαδή περίπου 5 mL που είναι και ο επιθυμητός όγκος. Τέλος, για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ουσίας στο διάλυμα ακετόνης χρησιμοποιείται η τιμή αυτή και υπολογίζεται ότι: $C = m \cdot 1000/V = (3,9319 \cdot 1000 \text{ g})/4,96 \text{ mL} \Rightarrow C = 7296,3 \text{ ppm}$.

Παρασκευή πυκνού διαλύματος 2,4,6-Τριχλωροφαινόλης με συγκέντρωση C = 7414,3 ppm:

Ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως και παραπάνω. Σε ογκομετρική φιάλη των 5 ml ζυγίζονται σε ζυγαριά ακριβείας και εισάγονται περίπου 36,7 mg της διαλυμένης ουσίας. Στη συνέχεια, προστίθεται περίπου 5 ml ακετόνης(έως της σχισμή της φιάλης) και το διάλυμα ξαναζυγίζεται. Η τελική τιμή που παίρνουμε είναι αυτή που θα χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ουσίας στο διάλυμα ακετόνης. Έχοντας υπολογίσει τη μάζα της διαλυμένης ουσίας (36,7mg) στην αρχή και τη μάζα του διαλύματος (3959,5mg) μετά την προσθήκη της ακετόνης, μπορεί να υπολογιστεί η μάζα μόνο του διαλύτη που ισούται με $(3959,5 - 36,7) = 3922,8$ mg = 3,9228 g. Στη συνέχεια, γνωρίζοντας την πυκνότητα της ακετόνης και την αντίστοιχη μάζα της υπολογίζεται ο όγκος της ακετόνης με τον εξής τρόπο: $V = m/\rho = 3,9228 \text{ g}/0,7925 \text{ g/mL} = 4,95 \text{ mL}$, δηλαδή περίπου 5 mL που είναι και ο επιθυμητός όγκος. Τέλος, για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ουσίας στο διάλυμα

ακετόνης χρησιμοποιείται η τιμή αυτή και υπολογίζεται ότι: $C = m \cdot 1000 / V = (3,9228 \cdot 1000 \text{ g}) / 4,95 \text{ mL} \Rightarrow C = 7414,3 \text{ ppm}$.

Παρασκευή πυκνού διαλύματος 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλης με συγκέντρωση $C = 7107,9 \text{ ppm}$:

Τέλος, παρασκευάζεται το πυκνό διάλυμα Τετραχλωροφαινόλης με την ίδια διαδικασία που παρασκευάστηκαν και για τις άλλες δύο ουσίες. Σε ογκομετρική φιάλη των 5 ml ζυγίζονται σε ζυγαριά ακριβείας και εισάγονται περίπου 35,7 mg της διαλυμένης ουσίας. Στη συνέχεια, προστίθεται περίπου 5 ml ακετόνης (έως της σχισμή της φιάλης) και το διάλυμα ξαναζυγίζεται. Η τελική τιμή που παίρνουμε είναι αυτή που θα χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ουσίας στο διάλυμα ακετόνης. Έχοντας υπολογίσει τη μάζα της διαλυμένης ουσίας (35,7mg) στην αρχή και τη μάζα του διαλύματος (4016,1mg) μετά την προσθήκη της ακετόνης, μπορεί να υπολογιστεί η μάζα μόνο του διαλύτη που ισούται με $(4016,1 - 35,7) = 3980,4 \text{ mg} = 3,9804 \text{ g}$. Στη συνέχεια, γνωρίζοντας την πυκνότητα της ακετόνης και την αντίστοιχη μάζα της υπολογίζεται ο όγκος της ακετόνης με τον εξής τρόπο: $V = m/\rho = 3,9804 \text{ g} / 0,7925 \text{ g/mL} = 5,02 \text{ mL}$, δηλαδή περίπου 5 mL που είναι και ο επιθυμητός όγκος. Τέλος, για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ουσίας στο διάλυμα ακετόνης χρησιμοποιείται η τιμή αυτή και υπολογίζεται ότι: $C = m \cdot 1000 / V = (3,9804 \cdot 1000 \text{ g}) / 5,02 \text{ mL} \Rightarrow C = 7107,9 \text{ ppm}$.

ο *Παρασκευή μίγματος σε ακετόνη*

Έπειτα, από τα παραπάνω πυκνά διαλύματα παρασκευάζεται μίγμα σε 10 ml ακετόνης με συγκεντρώσεις 20 ppm σε 2,4-Διχλωροφαινόλη, 20 ppm σε 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 40 ppm σε 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη αντίστοιχα, προκειμένου το μίγμα να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για την

παρασκευή των υδατικών δειγμάτων ανάλυσης και την εφαρμογή της μεθόδου της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού. Χρησιμοποιείται ογκομετρική φιάλη των 10 ml και η παρασκευή του μίγματος ακολουθεί το νόμο της αραίωσης. Σύμφωνα με το νόμο της αραίωσης, ισχύει ότι: $C_{αρχ} \cdot V_{αρχ} = C_{τελ} \cdot V_{τελ}$. Επομένως, υπολογίστηκε για τη κάθε ουσία ξεχωριστά ο όγκος που απαιτείται για την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης στο μείγμα. Παρακάτω παρουσιάζεται αναλυτικά ο ποσοτικός προσδιορισμός του όγκου αυτού για κάθε ουσία:

- Για τα 20 ppm σε 2,4-Διχλωροφαινόλη:
 $V_{αρχ} = (C_{τελ} \cdot V_{τελ}) / C_{αρχ} \Rightarrow$
 $V_{αρχ} = (20 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml}) / 7296,3 \text{ ppm} \Rightarrow V_{αρχ} = 27,4 \text{ μl}$
- Για τα 20 ppm σε 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη:
 $V_{αρχ} = (C_{τελ} \cdot V_{τελ}) / C_{αρχ} \Rightarrow$
 $V_{αρχ} = (20 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml}) / 7414,3 \text{ ppm} \Rightarrow V_{αρχ} = 27,0 \text{ μl}$
- Για τα 40 ppm σε 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη:
 $V_{αρχ} = (C_{τελ} \cdot V_{τελ}) / C_{αρχ} \Rightarrow$
 $V_{αρχ} = (20 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml}) / 7107,9 \text{ ppm} \Rightarrow V_{αρχ} = 56,3 \text{ μl}$

Εκτός, από το μίγμα με συγκεντρώσεις 20 ppm σε 2,4-Διχλωροφαινόλη, 20 ppm σε 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 40 ppm σε 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη 20:20:40 ppm κρίθηκε απαραίτητο (λόγω των υψηλών αποκρίσεων των ουσιών από τον αέριο χρωματογράφο και τη μη δυνατή ολοκλήρωση των αντίστοιχων χρωματογραφημάτων) να παρασκευασθούν και άλλα δύο μίγματα σε ακετόνη με συγκεντρώσεις 20 ppm σε 2,4-Διχλωροφαινόλη, 10 ppm σε 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 20 ppm σε 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη και 30 ppm σε 2,4-Διχλωροφαινόλη, 5 ppm σε 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 10 ppm σε 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη αντίστοιχα. Παρασκευάστηκαν με τον ίδιο τρόπο που έγινε και το πρώτο και οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται συνοπτικά στους Πίνακες 3 και 4 για κάθε μίγμα χωριστά.

Πίνακας 3: Όγκος κάθε ουσίας που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του μίγματος σε ακετόνη με συγκεντρώσεις 20 ppm σε 2,4-Διχλωροφαινόλη, 10 ppm σε 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 20 ppm σε 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη

V(μl)	Διάλυμα Ένωσης
27,4	2,4-Διχλωροφαινόλη
13,5	2,4,6-Τριχλωροφαινόλη
28	2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη

Πίνακας 4: Όγκος κάθε ουσίας που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του μίγματος σε ακετόνη με συγκεντρώσεις 30 ppm σε 2,4-Διχλωροφαινόλη, 5 ppm σε 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 10 ppm σε 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη

V(μl)	Διάλυμα Ένωσης
41,1	2,4-Διχλωροφαινόλη
6,74	2,4,6-Τριχλωροφαινόλη
14	2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη

ο Παρασκευή διαλυμάτων για ανάλυση

Τα πρότυπα διαλύματα εργασίας που χρησιμοποιούνταν για ανάλυση ετοιμάζονταν καθημερινά στα επιθυμητά επίπεδα συγκεντρώσεων και χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό από σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου ύδατος EASYpureRF. Αρχικά, έβγαινε από την κατάψυξη το μίγμα που είχε παρασκευαστεί με τις τρεις ουσίες και δεν χρησιμοποιούταν έως ότου έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να επιτευχθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια στον υπολογισμό του όγκου του διαλύματος. Έπειτα, για την παρασκευή αυτών των διαλυμάτων ακολουθήθηκε μια διαδικασία η οποία περιγράφεται παρακάτω:

- Ποσότητα υπερκάθολου νερού μεταφέρονταν σε ογκομετρική φιάλη όγκου 10 mL (έως το λαιμό της φιάλης), ίδιας με αυτή που χρησιμοποιούταν για την προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων.
- Σε κάθε διάλυμα πριν την ανάλυσή του γινόταν προσθήκη συγκεκριμένου όγκου από το ακετονικό μίγμα προκειμένου να επιτευχθούν τα επιθυμητά επίπεδα συγκέντρωσης.
- Προστίθενται υπερκάθαρο νερό έως τη σχισμή της ογκομετρική φιάλης αυτή τη φορά.
- Κάθε διάλυμα ομογενοποιούταν με χρήση χαμηλής συχνότητας υπερήχων για περίπου 15 δευτερόλεπτα.
- Από το διάλυμα λαμβανόταν με τη σύριγγα 10 ml Hamilton Gastight (Hamilton Bonaduz, NEVADA), Model 170SNR με αμβλεία βελόνα διάλυμα όγκου 9 ml που τοποθετούταν στο φιαλίδιο, αφού πρώτα είχαν δημιουργηθεί συνθήκες κενού αέρα.

2.3 Περιγραφή μεθόδου μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού

Σε αυτή την διπλωματική εργασία τα δείγματα αναλύονται με εφαρμογή της μεθόδου μικροεκχύλισης στερεής υπερκείμενης φάσης υπό συνθήκες κενού και αέρια χρωματογραφία, όπως έχει προαναφερθεί.

Η διαδικασία της μικροεκχύλισης στερεής φάσης υπό συνθήκες κενού είχε ως εξής:

Σε φιαλίδιο όγκου 1000 ml το οποίο έκλεινε με ελαστικό πώμα δημιουργούνται συνθήκες κενού χρησιμοποιώντας την αντλία αέρα. Με τη σύριγγα 10 ml Hamilton Gastight με αμβλεία βελόνα λαμβάνεται δείγμα όγκου 9 ml από το διάλυμα που παρασκευάστηκε για ανάλυση και εισάγεται στο φιαλίδιο. Το δοχείο με το δείγμα τοποθετούταν σε επωαστικό θάλαμο με θερμοκρασία 25 °C για να διατηρείται η θερμοκρασία της εκχύλισης σταθερή σε όλη τη

διάρκεια της εκχύλισης, όπου ήταν τοποθετημένη η συσκευή ανάδευσης (vortex) και αφηνόταν το δείγμα να αναδεύεται για 10 min και με ταχύτητα 160 rpm. Έπειτα, γινόταν η τοποθέτηση της ίνας σε καθορισμένη θέση πάνω από το φιαλίδιο, η οποία βρισκόταν εκτεθειμένη στον υπερκείμενο όγκο και αφηνόταν για χρόνο εκχύλισης 10 min. Στη συνέχεια, η ίνα επανατραβιόταν στη σύριγγα και η σύριγγα εισαγόταν στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου για 5 min, όπου γινόταν θερμική εκρόφηση των ουσιών και τέλος πραγματοποιούνταν η ανάλυσή τους.

Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της μεθόδου SPME μελετήθηκαν οι παράμετροι της εκχύλισης όπως ο τύπος της ίνας, ο όγκος του δείγματος, ο όγκος του φιαλιδίου που τοποθετούταν το δείγμα, το pH του δείγματος, η αλατότητα του δείγματος, η θερμοκρασία εκχύλισης, ο χρόνος εκχύλισης, ο χρόνος ανάδευσης, η ταχύτητα ανάδευσης και τέλος οι συνθήκες κενού και μη κενού αέρα. Πιο συγκεκριμένα, οι παράμετροι της εκχύλισης που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Παράμετροι εκχύλισης

Τύπος ίνας	100 μm PDMS, 65 μm PDMS/DVB, 85 μm PA, 75 μm CAR/PDMS, 65 μm CW/DVB
Όγκος δείγματος (ml)	5 - 20
Όγκος φιαλιδίου (ml)	125 - 1000
pH δείγματος	2 - 9
NaCl δείγματος (%)	0 - 30
Θερμοκρασία εκχύλισης (°C)	25-45
Χρόνος εκχύλισης (min)	10-30
Χρόνος ανάδευσης (min)	5-15
Ταχύτητα ανάδευσης (rpm)	0-160

Πριν από τη χρήση των ινών SPME έγινε conditioning (σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Supelco)) για την ενεργοποίηση των πόρων των ινών. Στο conditioning η ίνα εκτίθεται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Οι συνθήκες conditioning, όπως επίσης και οι συνθήκες για τη σωστή χρήση των ινών παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Συνιστώμενες θερμοκρασίες για τη σωστή χρήση των ινών σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Supelco) [5]

Είδος Ίνας	Πάχος ίνας (μm)	Προτεινόμενο εύρος θερμοκρασιών ($^{\circ}\text{C}$)	Θερμοκρασία Conditioning ($^{\circ}\text{C}$)	Χρόνος Conditioning (hr)
PDMS	100	200-280	250	0,5
PDMS/DVB	65	200-270	250	0,5
PA	85	220-310	300	2
DVB/CAR/PDMS	75	250-310	300	1-2
CW/DVB	65	200-250	220	0,5

2.4 Περιγραφή μεθόδου χρωματογραφικής ανάλυσης με αέρια χρωματογραφία (GC-ECD)

Όλες οι αναλύσεις κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, έγιναν στο σύστημα Shimadzu GC-17A-ECD, με σύστημα εισαγωγής split/splitless. Για την ανάλυση των χλωροφαινολών επιλέχθηκε ένα σετ ρυθμίσεων του αέριου χρωματογράφου προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η εκλεκτικότητα και η ευαισθησία των αναλύσεων. Η θερμοκρασία του χώρου εισαγωγής του

δείγματος ήταν 280°C (injector temperature). Ο αέριος χρωματογράφος λειτούργησε χωρίς διαμοιρασμό (splitless mode), για 5 λεπτά. Η κολώνα που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των χλωροφαινολών ήταν μία HP5-MS μήκους 30 m με εσωτερική διάμετρο 0.25 mm και πάχους φιλμ 0.25 μm. Σαν φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο (καθαρότητα >99,99 %) με σταθερή πίεση στα 80 kPa. Το ήλιο ήταν με ροή 28 mL/min. Οι χρωματογραφικές συνθήκες που τελικά χρησιμοποιήθηκαν, είχαν προηγουμένως βελτιστοποιηθεί έτσι ώστε να επιτυγχάνεται τέλειος διαχωρισμός μεταξύ των ουσιών. Η θερμοκρασία του ανιχνευτή ECD ήταν 300°C. Το πρόγραμμα θερμοκρασίας φούρνου παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Πρόγραμμα θερμοκρασιών φούρνου

Βήμα	Ρυθμός αύξησης (°C / min)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος ισορροπίας (min)
Αρχικά		70	2
1	8	190	0
2	15	220	2

Τέλος, ο αέριος χρωματογράφος ήταν συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή στον οποίο είχε εγκατασταθεί κατάλληλο πρόγραμμα επεξεργασίας των χρωματογραφημάτων και ολοκλήρωσης των χρωματογραφικών κορυφών (Shimadzu Class-VP Chromatographic Data System (Version 4.3)).

Πριν από την εφαρμογή της μεθόδου SPME, έγινε ένεση 1 μl στον αέριο χρωματογράφο από το μίγμα των ουσιών σε εξάνιο που υπήρχε ήδη από προηγούμενες αναλύσεις στα ψυγεία του εργαστηρίου. Η ποσότητα αυτή λήφθηκε από το διάλυμα-μίγμα των ουσιών σε εξάνιο με συγκεντρώσεις 20 ppb σε 2,4-Διχλωροφαινόλη, 20 ppb σε 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 40 ppb σε 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη. Η διαδικασία αυτή έγινε με στόχο να υπολογιστεί ο χρόνος συγκράτησης της κάθε ουσίας από τον αέριο χρωματογράφο και τα

αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Γνωρίζοντας το χρόνο συγκράτησης, έγινε εύκολα η αναγνώριση των ουσιών αυτών, γεγονός πολύ σημαντικό καθώς κατά την εφαρμογή της μεθόδου SPME χρησιμοποιήθηκε το μίγμα των ουσιών και όχι κάθε ουσία χωριστά.

Πίνακας 8: Χρόνοι συγκράτησης των αναλυόμενων ουσιών

Αναλυόμενη ουσία	Χρόνος Συγκράτησης (min)
2,4–Διχλωροφαινόλη	9,825
2,4,6–Τριχλωροφαινόλη	13,317
2,3,4,6–Τετραχλωροφαινόλη	16,817

Στην αρχή κάθε ημέρας, η ίνα μαζί με το σύστημα συγκράτησής της τοποθετούνταν στον εισαγωγέα για 5 λεπτά ενώ η ανάλυση συνεχιζόταν κανονικά έως ότου να ολοκληρωθεί το πρόγραμμα θερμοκρασιών του φούρνου. Αυτό γινόταν για τον πλήρη καθαρισμό της στήλης και της ίνας.

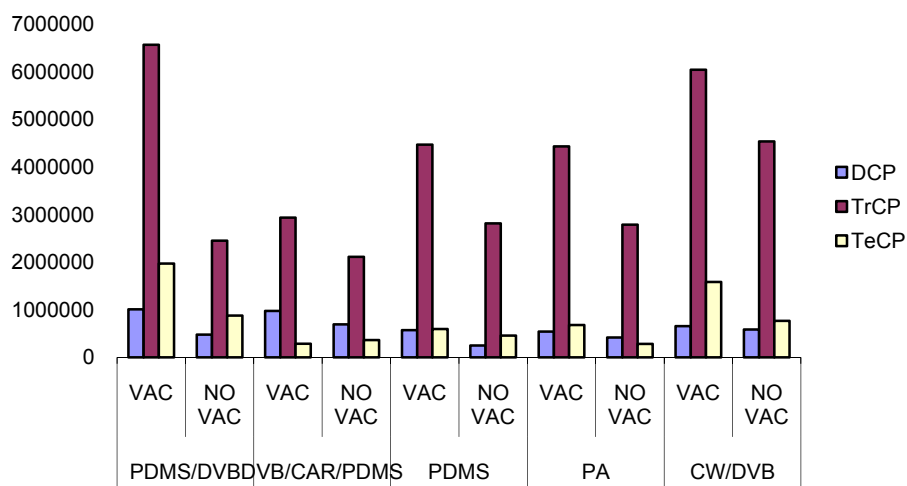
Στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου τοποθετούνταν ένα ελαστικό πώμα Thermogreen LB-2 (Supelco), το οποίο αντικαθιστούταν σε τακτά χρονικά διαστήματα (περίπου κάθε δύο μέρες). Ο λόγος της αλλαγής του ήταν ότι παρατηρήθηκε διαρροή μετά από αρκετές αναλύσεις με το ίδιο πώμα.

3 Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1 Επιλογή τύπου ίνας

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού με διαφορετικούς τύπους ινών εκτιμήθηκε ποιος τύπος ίνας είναι καταλληλότερος για την ανάλυση των χλωροφαινολών. Δοκιμάστηκαν πέντε διαφορετικοί τύποι ίνας και είναι οι εξής: 65 μm PDMS/DVB, 75 μm

DVB/CAR/PDMS, 100 μm PDMS, 85 μm PA και 65 μm CW/DVB. Οι συνθήκες στις οποίες έγιναν αυτές οι αναλύσεις παρουσιάζονται παρακάτω: συνθήκες κενού αέρα, εισαγωγή 9 ml δείγματος σε απιονισμένο νερό με συγκέντρωση 40 $\mu\text{g/l}$ σε 2,4-Διχλωροφαινόλη, 40 $\mu\text{g/l}$ σε 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 80 $\mu\text{g/l}$ σε 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη, χρόνος ανάδευσης 5 min με ταχύτητα ανάδευσης 160 rpm, χρόνος δειγματοληψίας 10 min και θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Οι ίδιες αναλύσεις έγιναν και σε συνθήκες μη κενού αέρα με σταθερές τις υπόλοιπες παραμέτρους. Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων παρουσιάζονται συνοπτικά στο Γράφημα 1.



Γράφημα 1: Επίδραση του τύπου ίνας στην αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης σε συνθήκες κενού (VAC) και μη κενού αέρα (NO VAC)

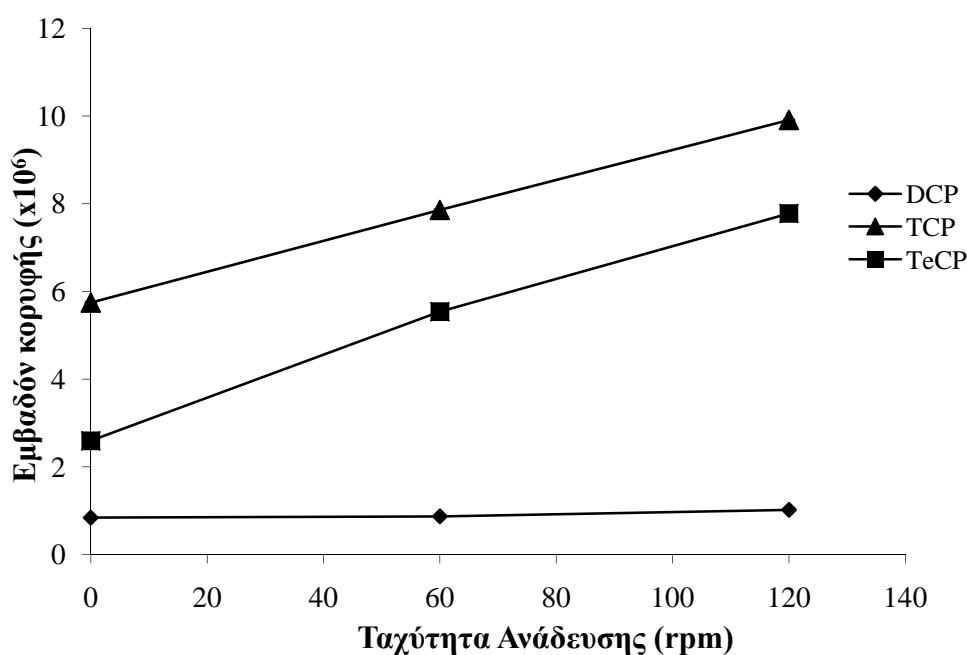
Τα αποτελέσματα για τη μελέτη της επίδρασης του τύπου ίνας στην αποδοτικότητα της μεθόδου μικροεκχύλισης στο Γράφημα 1 αποδεικνύουν την εξάρτηση της απορρόφησης των ουσιών από τον τύπο της ίνας. Οι πέντε τύποι ινών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κατάλληλοι για τις αναλύσεις με αέρια χρωματογραφία. Παρατηρείται ότι η ίνα DVB/CAR/PDMS έδωσε το μικρότερο σήμα για τις ουσίες 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη από όλες τις ίνες, ενώ για την ουσία 2,4-Διχλωροφαινόλη έδωσε το μεγαλύτερο σήμα μαζί με την ίνα PDMS/DVB. Η τελευταία παρουσίασε τη

μεγαλύτερη απόκριση και στις τρεις ουσίες σχετικά με τις υπόλοιπες ίνες. Έτσι, στην επιλογή της καταλληλότερης ίνας για τα πειράματα, απορρίφθηκε αρχικά η ίνα DVB/CAR/PDMS λόγω της μικρής απόκρισης των ουσιών 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη από τον αέριο χρωματογράφο. Η ίνα PDMS/DVB απορρίφθηκε λόγω μη σταθερότητας και επαναληψιμότητας που παρουσίασε στις αναλύσεις. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην κατακράτηση και μεταφορά των ουσιών στους πόρους της ίνας από τη μία ανάλυση στην επόμενη, με αποτέλεσμα την αλλοίωση των ορθών αποτελεσμάτων. Επίσης, η ίνα PDMS/DVB απορρίφθηκε διότι εφαρμόζεται κυρίως σε αρωματικούς υδρογονάνθρακες και σε διαλύτες. Οι ίνες PDMS και PA έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα και για τις τρεις ουσίες. Απορρίφθηκε, όμως η ίνα PDMS, καθώς είναι μη πολική και παρουσιάζει μία υψηλή έλξη για τα μη πολικά μίγματα, όπως BTEX μείγματα (βενζένιο, τολουένιο, εθυλοβενζένιο, ξυλένιο), πτητικές οργανικές ουσίες και κάποια μικροβιοκτόνα [1,5]. Ακόμη, τα αποτελέσματα της ίνας CW/DVB ήταν ικανοποιητικά για τη 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη, αλλά όχι τόσο για τη 2,4-Διχλωροφαινόλη. Ωστόσο, απορρίφθηκε διότι είναι πιο πολική ίνα από τις άλλες και είναι κατάλληλη για περισσότερο πολικά μίγματα, όπως οι αλκοόλες [1,5]. Τελικά, επιλέχθηκε η ίνα PA ως καταλληλότερη για τις αναλύσεις των χλωροφαινόλων γιατί είναι κατασκευασμένη για εφαρμογή σε πολικά πτητικά μίγματα, όπως οι τριαζίνες και φαινόλες [5]. Τέλος, παρατηρώντας το Γράφημα 1 επιβεβαιώνεται ότι οι συνθήκες κενού αέρα αυξάνουν σημαντικά την αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης, καθώς ενισχύουν σημαντικά τα σήματα των τριών ουσιών. Αυτό παρατηρείται στα αποτελέσματα και των πέντε διαφορετικών ινών που χρησιμοποιήθηκαν.

3.2 Επιλογή ταχύτητας ανάδευσης

Η επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης του δείγματος στην αποδοτικότητα της μεθόδου μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού μελετήθηκε μεταβάλλοντας την ταχύτητα ανάδευσης κατά τη διάρκεια της έκθεσης της ίνας στο δείγμα από 0 έως 120 rpm. Δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές ταχύτητες ανάδευσης: 0 rpm, 60 rpm και 120 rpm. Οι συνθήκες στις οποίες έγιναν αυτές

οι αναλύσεις είναι οι εξής: συνθήκες κενού αέρα σε φιαλίδιο όγκου 1000 ml, εισαγωγή 9 ml δείγματος σε απιονισμένο νερό με συγκέντρωση 5000 ppt σε 2,4-Διχλωροφαινόλη, 2500 ppt σε 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 5000 ppt σε 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη, χρόνος ανάδευσης 10 min με ταχύτητα ανάδευσης 160 rpm, χρόνος δειγματοληψίας 10 min και θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων παρουσιάζονται στο Γράφημα 2.



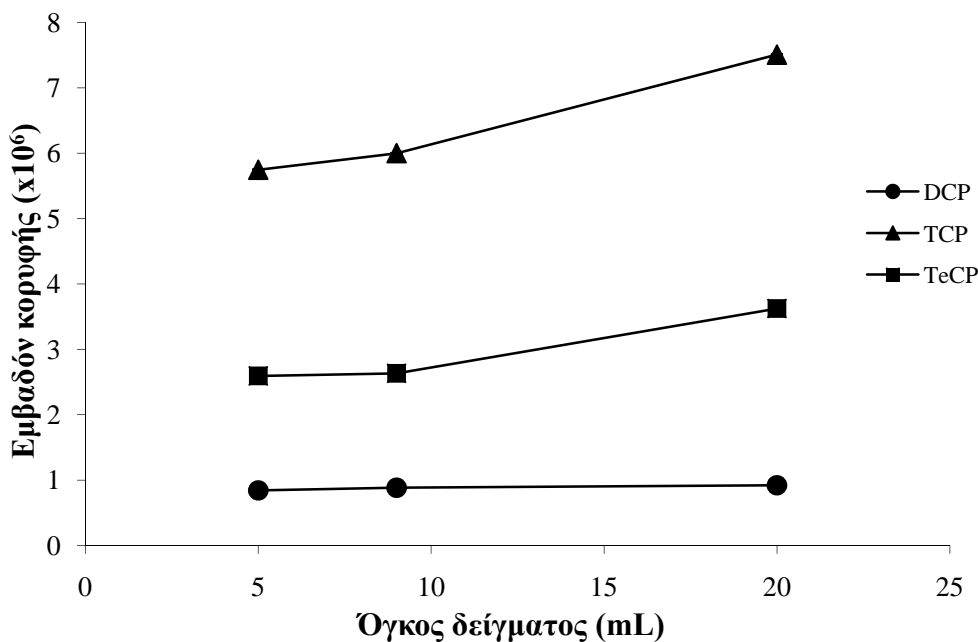
Γράφημα 2: Επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης στην αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό κενό

Τα αποτελέσματα για την μελέτη της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης του δείγματος στην μέθοδο μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό κενό στο Γράφημα 2 αποδεικνύουν την εξάρτηση της αποδοτικότητας της μεθόδου από την ταχύτητα ανάδευσης. Παρατηρείται ότι η ουσία 2,4-Διχλωροφαινόλη δεν επηρεάζεται σχεδόν καθόλου αυξάνοντας την ταχύτητα ανάδευσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η 2,4-Διχλωροφαινόλη είναι η πιο πτητική από τις ουσίες μας, με αποτέλεσμα να μεταβαίνει εύκολα από την υγρή φάση στον υπερκείμενο αέρα του δείγματος χωρίς να απαιτείται ισχυρή ανάδευση κατά τη δειγματοληψία. Για τις ουσίες 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη παρατηρείται βελτίωση των σημάτων αυξάνοντας την

ταχύτητα ανάδευσης κατά την μικροεκχύλιση. Μεγαλύτερη ενίσχυση παρατηρείται για την ουσία 2,3,4,6–Τετραχλωροφαινόλη, διότι είναι η λιγότερη πτητική από τις άλλες δύο αφού περιέχει τέσσερα άτομα χλωρίου και έτσι η ανάδευση του μίγματος τη διευκολύνει να μεταφερθεί στον υπερκείμενο αέρα από το υγρό μίγμα [5]. Για την ουσία 2,4,6–Τριχλωροφαινόλη παρατηρείται καλύτερη απόδοση της μεθόδου αυξάνοντας την ταχύτητα ανάδευσης από ότι για την 2,4–Διχλωροφαινόλη, αλλά μικρότερη από ότι για την 2,3,4,6–Τετραχλωροφαινόλη, διότι η πτητικότητα της είναι μικρότερη από την 2,4–Διχλωροφαινόλη και μεγαλύτερη από την 2,3,4,6–Τετραχλωροφαινόλη. Συμπερασματικά, επιλέχθηκε η μηδενική ταχύτητα ανάδευσης, καθώς οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν αυξάνοντας την ταχύτητα ανάδευσης του δείγματος δεν είναι σημαντικές. Επιπλέον, η μηδενική ταχύτητα ανάδευσης κρίθηκε καταλληλότερη και για λόγους προστασίας της ίνας.

3.3 Επιλογή όγκου δείγματος

Ο όγκος του δείγματος που αναλύεται είναι μία παράμετρος που επιδρά σημαντικά στην αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού, καθώς σχετίζεται άμεσα με την ευαισθησία της μεθόδου. Η επίδραση του όγκου του δείγματος στη μέθοδο της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού μελετήθηκε μεταβάλλοντας τον όγκο που αναλύεται από 5 ml έως 20 ml. Δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικοί όγκοι δείγματος: 5 ml, 9 ml και 20 ml. Οι συνθήκες στις οποίες έγιναν αυτές οι αναλύσεις είναι οι εξής: συνθήκες κενού αέρα, εισαγωγή δείγματος σε απιονισμένο νερό με συγκέντρωση 5000 ppt σε 2,4-Διχλωροφαινόλη, 2500 ppt σε 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 5000 ppt σε 2,3,4,6–Τετραχλωροφαινόλη, χρόνος ανάδευσης 10 min με ταχύτητα ανάδευσης 160 rpm, χρόνος δειγματοληψίας 10 min χωρίς ανάδευση και θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Τα ίδια πειράματα έγιναν και υπό συνθήκες μη κενού αέρα. Στο Γράφημα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων για τους τρεις όγκους δείγματος υπό συνθήκες κενού αέρα.



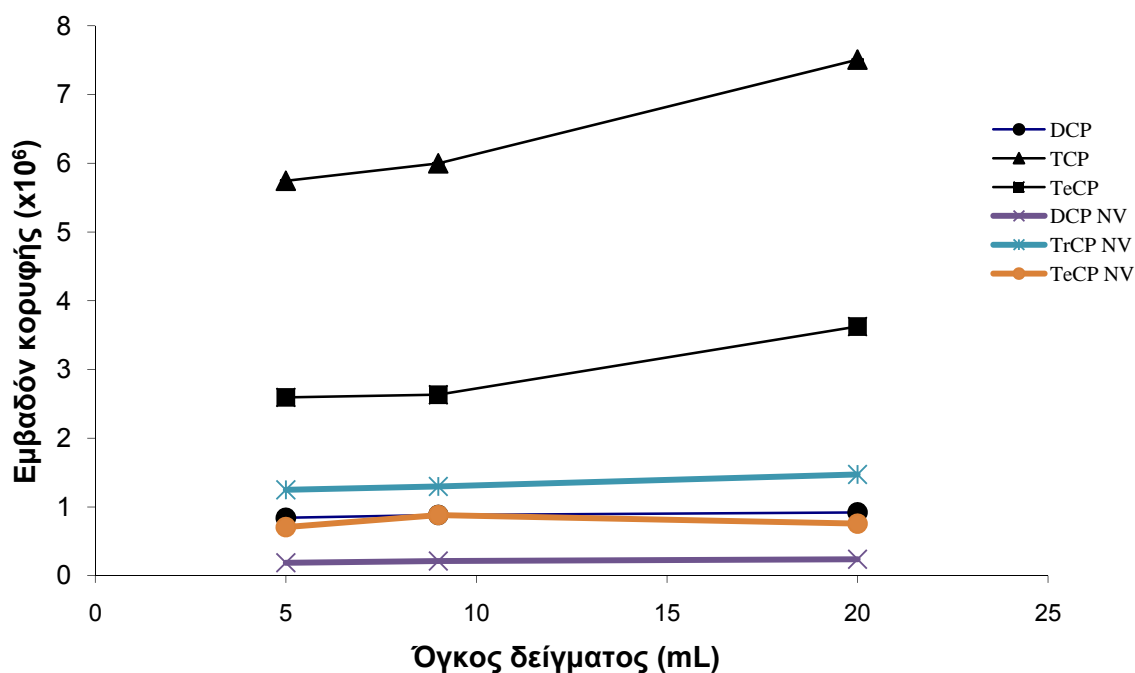
Γράφημα 3: Επίδραση του όγκου του δείγματος στην αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό κενό

Από το Γράφημα 3 φαίνεται πόσο επηρεάζεται η αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό κενό από την αύξηση του όγκου του δείγματος από 5 ml έως 20 ml. Παρατηρείται ότι η απορρόφηση της ουσίας 2,4-Διχλωροφαινόλη δεν επηρεάζεται σημαντικά αυξάνοντας τον όγκο του δείγματος. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η 2,4-Διχλωροφαινόλη είναι η πιο πτητική από τις αναλυόμενες ουσίες μας, με αποτέλεσμα να μεταβαίνει εύκολα από την υγρή φάση στον υπερκείμενο αέρα του δείγματος και να μην επηρεάζεται από τη μείωση αυτού λόγω της αντίστοιχης αύξησης του όγκου δείγματος. Ακόμη, η ουσία 2,4-Διχλωροφαινόλη παρουσιάζει χαμηλή απόκριση από τον αέριο χρωματογράφο, με αποτέλεσμα οι μεταβολές στα αντίστοιχα σήματα να μην είναι σημαντικές. Για τις ουσίες 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη παρατηρείται παρόμοια βελτίωση της αποδοτικότητας της μεθόδου αυξάνοντας τον όγκο του δείγματος. Η μείωση του υπερκείμενου αέρα μέσα στο φιαλίδιο διευκολύνει τις δύο ουσίες να μεταφερθούν από το υγρό μίγμα στην αέρια φάση και έτσι αυξάνεται η απορρόφησή τους από τους πόρους της ίνας.

Τελικά, επιλέχθηκε ως καταλληλότερος όγκος του δείγματος τα 9 ml, διότι το δείγμα εισάγεται στο φιαλίδιο με σύριγγα 10 ml και για τα 20 ml

χρησιμοποιούνταν η σύριγγα δύο φορές, με αποτέλεσμα να έχουμε τυχόν αλλοίωση της συγκέντρωσης του δείγματος. Έτσι, για λόγους απαλοιφής πιθανού σφάλματος επιλέχθηκαν τα 9 ml ως καταλληλότερος όγκος του δείγματος.

Στο Γράφημα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων για τους τρεις όγκους δείγματος υπό συνθήκες κενού και μη κενού αέρα.



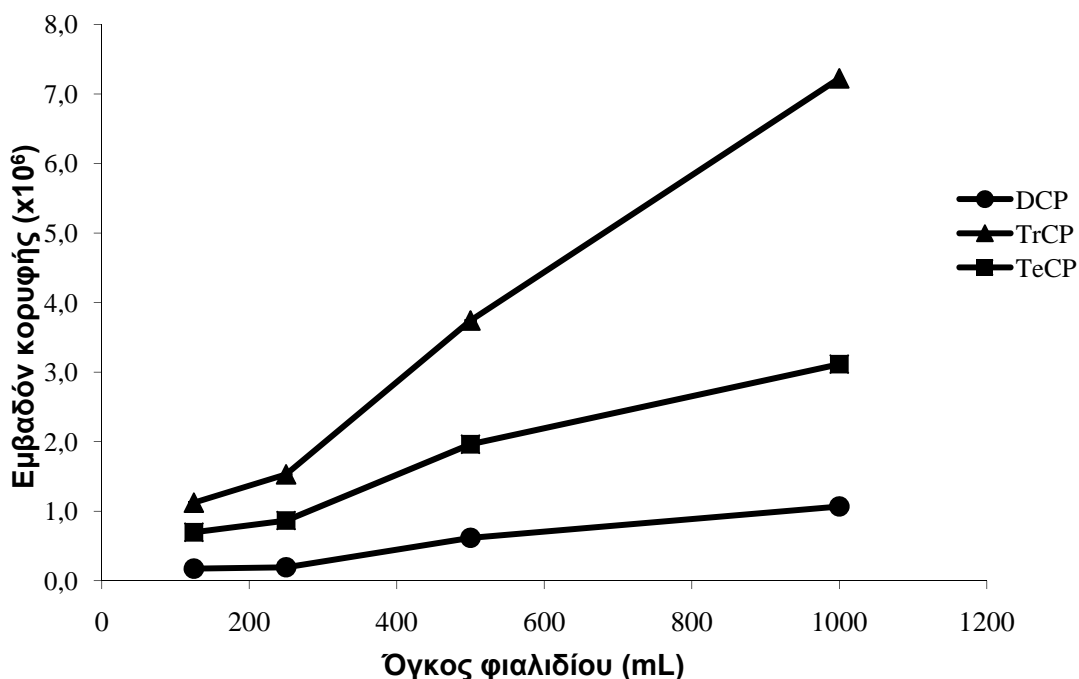
Γράφημα 4: Επίδραση του όγκου του δείγματος στην αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού και μη κενού αέρα

Παρατηρώντας το Γράφημα 4 επιβεβαιώνεται ότι η αποδοτικότητα της μεθόδου μικροεκχύλισης στερεάς φάσης βελτιώνεται σημαντικά όταν πραγματοποιείται υπό συνθήκες κενού. Αυτό παρατηρείται στα αποτελέσματα και των τριών όγκων δείγματος που δοκιμάστηκαν.

3.4 Επιλογή όγκου φιαλιδίου

Ο όγκος του φιαλιδίου, όπου εισάγεται το δείγμα και η ίνα για δειγματοληψία, επιδρά σημαντικά στην αποδοτικότητα της μεθόδου μικροεκχύλισης στερεάς

φάσης υπό συνθήκες κενού. Σε αυτήν την εργασία μελετήθηκε η επίδραση αυτή, μεταβάλλοντας τον όγκο του φιαλιδίου από 125 έως 1000 ml. Δοκιμάστηκαν τέσσερις διαφορετικοί όγκοι δείγματος: 125 ml, 250 ml, 500 ml και 1000 ml. Οι συνθήκες στις οποίες έγιναν αυτά τα πειράματα είναι οι εξής: συνθήκες κενού αέρα, εισαγωγή 9 ml δείγματος σε απιονισμένο νερό με συγκέντρωση 5000 ppt σε 2,4-Διχλωροφαινόλη, 2500 ppt σε 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 5000 ppt σε 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη, χρόνος ανάδευσης 10 min με ταχύτητα ανάδευσης 160 rpm, χρόνος δειγματοληψίας 10 min χωρίς ανάδευση και θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Οι ίδιες αναλύσεις έγιναν και υπό συνθήκες μη κενού αέρα με σταθερές τις υπόλοιπες παραμέτρους. Στο Γράφημα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων για τους τέσσερις όγκους του φιαλιδίου που εξετάστηκαν υπό συνθήκες κενού.

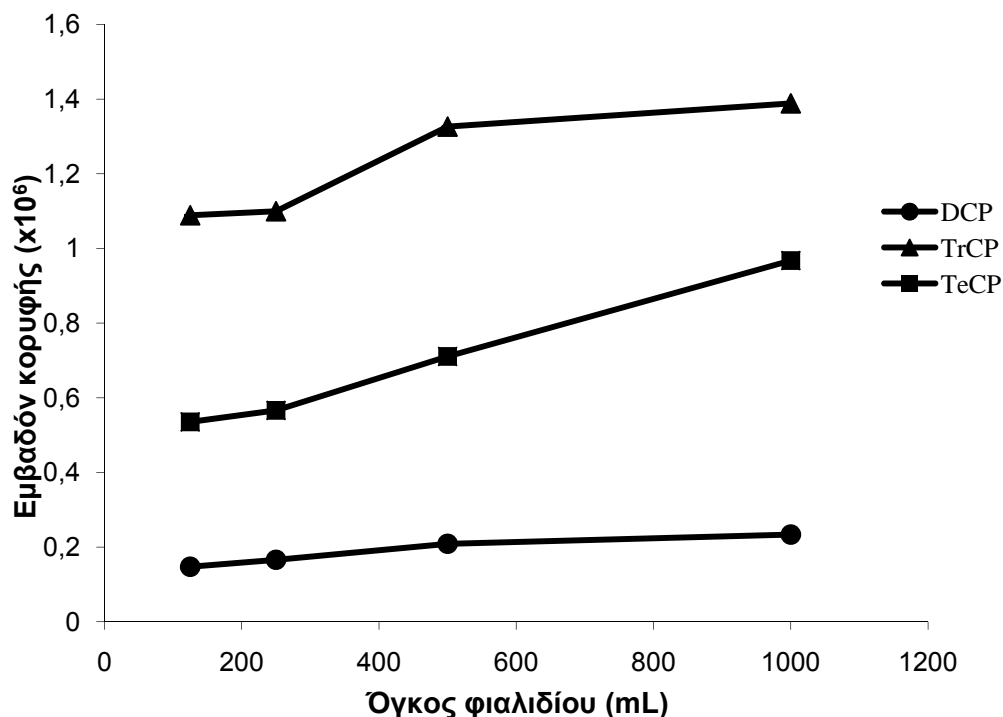


Γράφημα 5: Επίδραση του όγκου του φιαλιδίου στην αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό κενό

Από το Γράφημα 5 βλέπουμε ότι η αύξηση του όγκου του φιαλιδίου επηρεάζει σημαντικά την αποδοτικότητα της μεθόδου μας. Παρατηρείται ότι και οι τρεις αναλυόμενες ουσίες παρουσιάζουν ενίσχυση του σήματος από τον αέριο

χρωματογράφο όσο αυξάνεται ο όγκος του φιαλιδίου. Εύλογα λοιπόν, επιλέχθηκε ως καταλληλότερος όγκος του φιαλιδίου τα 1000 ml, διότι παρατηρείται ότι βελτιστοποιεί την μέθοδο μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού.

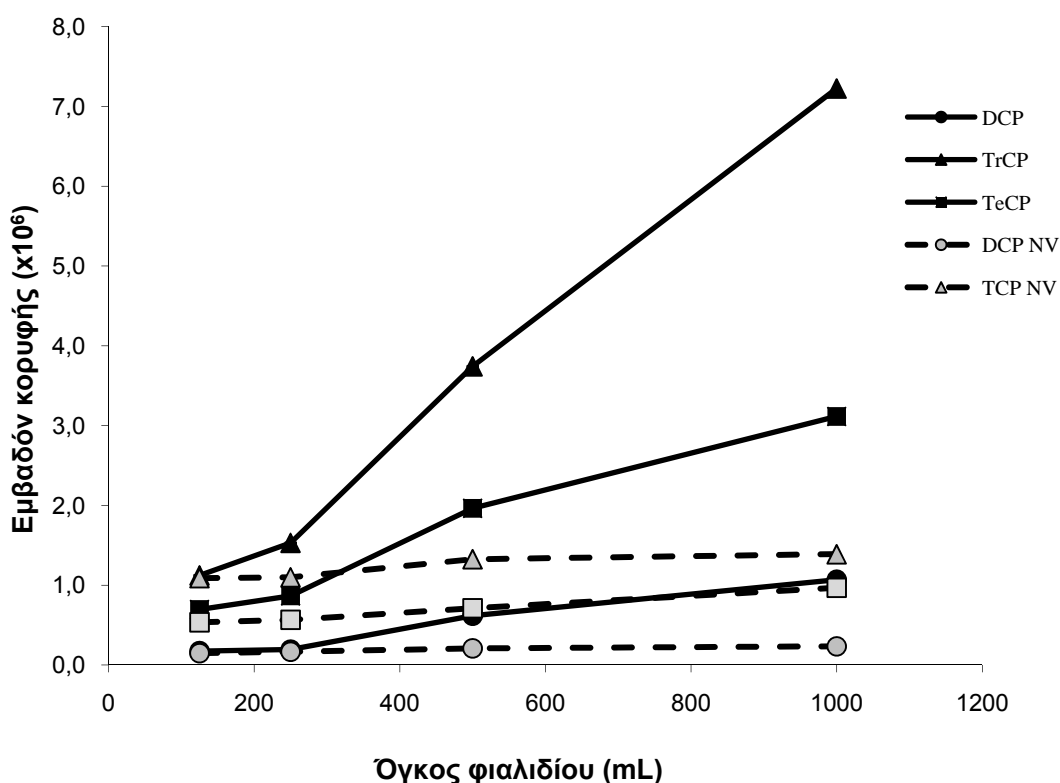
Στο Γράφημα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τους τέσσερις όγκους του φιαλιδίου που εξετάστηκαν υπό συνθήκες μη κενού αέρα.



Γράφημα 6: Επίδραση του όγκου του φιαλιδίου στην αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες μη κενού

Από το Γράφημα 6 παρατηρείται ότι η αύξηση του όγκου του φιαλιδίου βελτιώνει την αποδοτικότητα της μεθόδου μικροεκχύλισης στερεάς φάσης, ακόμη και όταν πραγματοποιείται υπό συνθήκες μη κενού. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η βελτίωση αυτή δεν είναι τόσο σημαντική όσο υπό συνθήκες κενού λόγω της χαμηλής απόκρισης των ουσιών από τον αέριο χρωματογράφο και της χαμηλής πίεσης που επικρατεί στο φιαλίδιο.

Τέλος, στο Γράφημα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων για τους τέσσερις όγκους του φιαλιδίου υπό συνθήκες κενού και μη κενού αέρα μαζί.



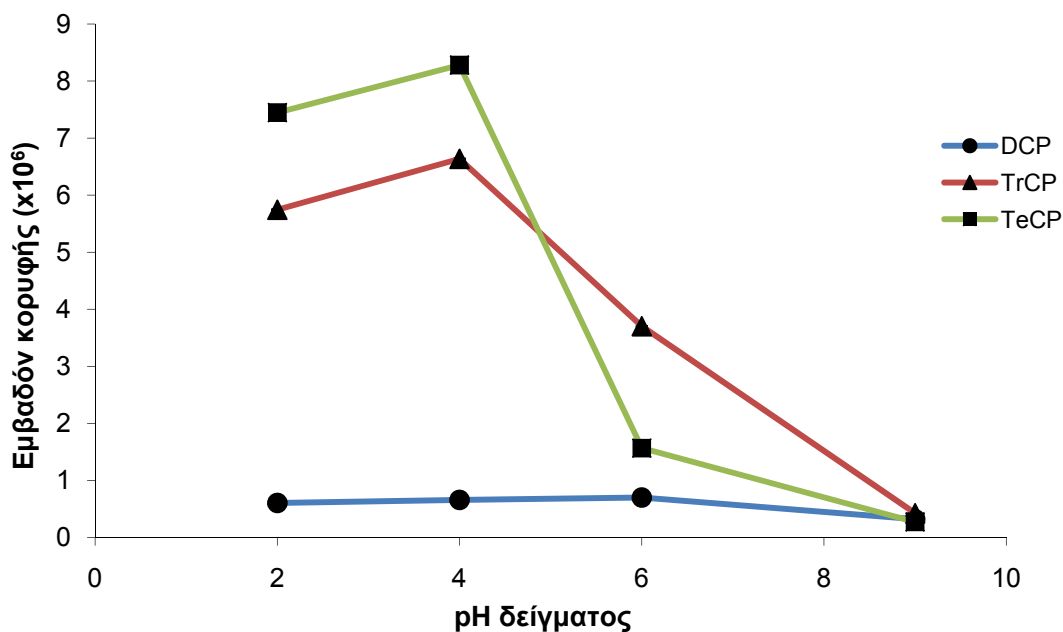
Γράφημα 7: Επίδραση του όγκου του φιαλιδίου στην αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεάς υπό συνθήκες κενού και μη κενού αέρα

Παρατηρώντας το Γράφημα 7 επιβεβαιώνεται ότι η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού παρουσιάζει καλύτερη αποδοτικότητα σχετικά με την αντίστοιχη μέθοδο υπό συνθήκες μη κενού. Επομένως, είναι προτιμότερο η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης να πραγματοποιείται υπό συνθήκες κενού.

3.5 Επιλογή pH του δείγματος

Η οξύτητα ενός δείγματος επηρεάζει άμεσα τα αποτελέσματα ενός πειράματος που χρησιμοποιεί τη μέθοδο της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού. Αυτή η επίδραση μελετήθηκε μεταβάλλοντας το pH του δείγματος από 2 έως 9. Δοκιμάστηκαν τέσσερις διαφορετικές τιμές pH δείγματος: 2, 4, 6 και 9. Οι συνθήκες στις οποίες έγιναν αυτά τα πειράματα είναι οι εξής: συνθήκες κενού αέρα, εισαγωγή 9 ml δείγματος σε απιονισμένο νερό με συγκέντρωση 3000 ppt σε 2,4-Διχλωροφαινόλη, 1500 ppt σε 2,4,6-

Τριχλωροφαινόλη και 3000 ppt σε 2,3,4,6–Τετραχλωροφαινόλη, χρόνος ανάδευσης 10 min με ταχύτητα ανάδευσης 160 rpm, χρόνος δειγματοληψίας 10 min χωρίς ανάδευση και θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Τα αποτελέσματα που έδωσαν τα παραπάνω πειράματα παρουσιάζονται στο Γράφημα 8.



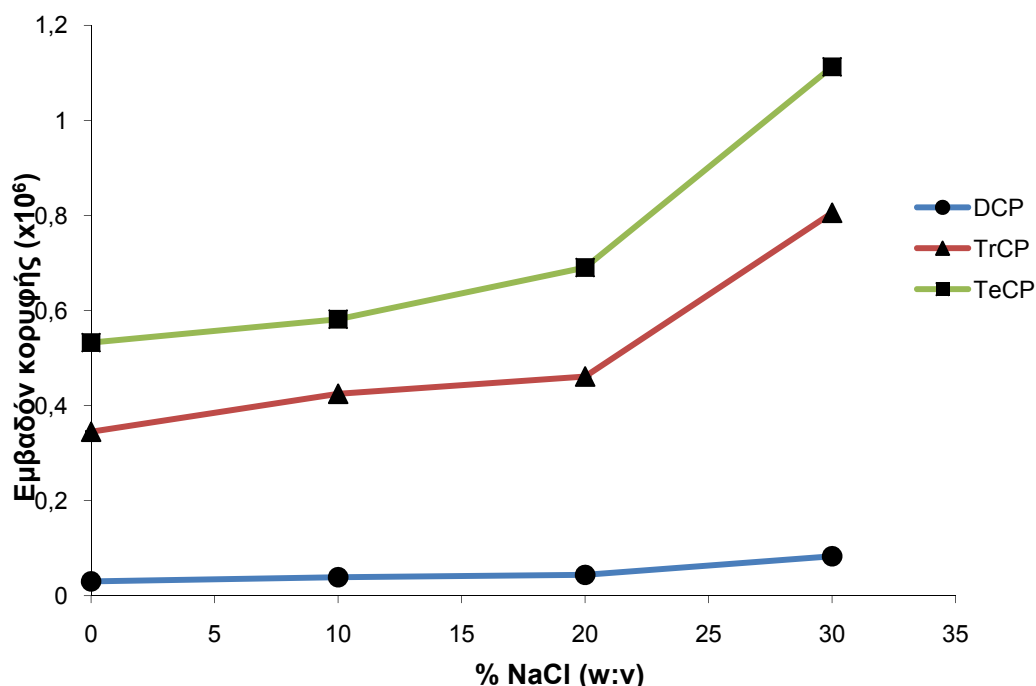
Γράφημα 8: Επίδραση του pH του δείγματος στην αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό κενό

Το Γράφημα 8 επιβεβαιώνει ότι η τιμή pH ενός δείγματος επηρεάζει σημαντικά την αποδοτικότητα της μεθόδου της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού. Η επιρροή του pH του δείγματος στην απορρόφηση των χλωροφαινολών βασίζεται στην τιμή pK_a κάθε ουσίας [1,5]. Έτσι, η ουσία 2,4–Διχλωροφαινόλη που έχει υψηλή τιμή pK_a (7,90) δεν παρουσιάζει σημαντική αλλαγή στο ποσοστό απορρόφησης όταν η τιμή του pH του δείγματος μεταβάλλεται από 2 έως 9. Ακόμη, η ουσία 2,4,6–Τριχλωροφαινόλη που έχει μικρότερη τιμή pK_a (6,00) από την 2,4–Διχλωροφαινόλη παρουσιάζει μεγαλύτερη αλλαγή στο ποσοστό απορρόφησης της από τους πόρους της ίνας. Πιο συγκεκριμένα, όταν το pH του δείγματος είναι ίσο με 4 έχει τη μεγαλύτερη απόκριση από τον αέριο χρωματογράφο, ενώ όσο το pH του δείγματος αυξάνεται σε 6 και 9, δηλαδή γίνεται βασικό το σήμα μειώνεται ανάλογα. Το ίδιο παρατηρείται και για την ουσία 2,3,4,6–Τετραχλωροφαινόλη

που έχει τη μικρότερη τιμή pK_a (5,22). Παρουσιάζει ενίσχυση του σήματος για pH του δείγματος ίσο με 4, ενώ το σήμα μειώνεται πολύ όταν το pH του δείγματος γίνεται βασικό, δηλαδή όταν παίρνει τιμές 6 και 9. Έτσι, τελικά επιλέγεται ως καταλληλότερη τιμή pH του δείγματος η τιμή 4, όπου έχουμε τη βέλτιστη αποδοτικότητα της μεθόδου.

3.6 Επιλογή ποσότητας NaCl του δείγματος

Ακολούθως μελετήθηκε η πιθανή επίδραση της αποδοτικότητας της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού με την προσθήκη NaCl στα υδατικά δείγματα. Δοκιμάστηκαν τέσσερις διαφορετικές ποσότητες NaCl: 0%, 10%, 20% και 30%. Οι συνθήκες στις οποίες έγιναν αυτά τα πειράματα είναι οι εξής: συνθήκες κενού αέρα, εισαγωγή 9 ml δείγματος σε απιονισμένο νερό με συγκέντρωση 100 ppt σε 2,4-Διχλωροφαινόλη, 50 ppt σε 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 100 ppt σε 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη, pH δείγματος ίσο με 4, χρόνος ανάδευσης 10 min με ταχύτητα ανάδευσης 160 rpm, χρόνος δειγματοληψίας 10 min χωρίς ανάδευση και θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων παρουσιάζονται στο Γράφημα 9.



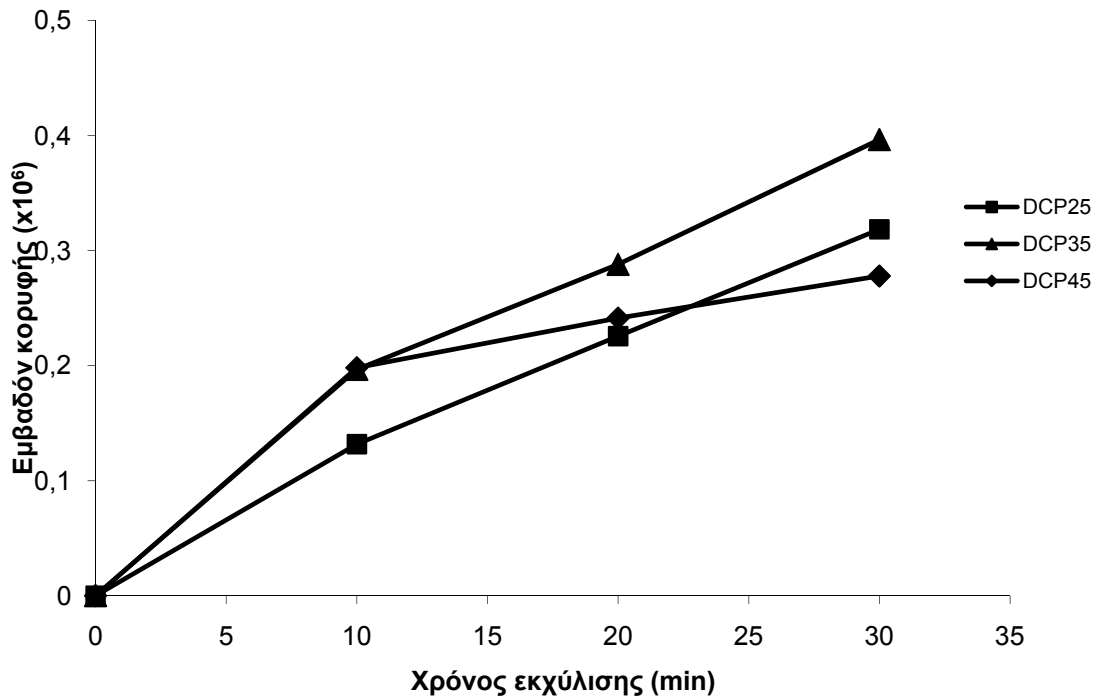
Γράφημα 9: Επίδραση της ποσότητας NaCl του δείγματος στην αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό κενό

Γενικά, είναι γεγονός ότι η προσθήκη άλατος στα υδατικά διαλύματα μπορεί να μειώσει την διαλυτότητά τους στο νερό με αποτέλεσμα την αύξηση της υδροφοβικότητάς τους. Αυτό οφείλεται στο φαινόμενο της εξαλάτωσης, δηλαδή στο γεγονός ότι τα μόρια του νερού προτιμούν να περιβάλουν τα ιόντα του ηλεκτρολύτη και κατά συνέπεια μειώνονται τα διαθέσιμα μόρια του νερού για την διάλυση των διαλυμένων ουσιών. Επιπλέον, οι αδύναμες διαμοριακές δυνάμεις μεταξύ των οργανικών ουσιών ή μη ηλεκτρολυτών και του νερού μπορούν να διαταραχθούν από την ενυδάτωση των ηλεκτρολυτών [19]. Το Γράφημα 9 επιβεβαιώνει ότι η αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού βελτιώθηκε με την προσθήκη άλατος στο αναλυόμενο υδατικό διάλυμα [1,5]. Η καλύτερη απόδοση της μεθόδου επιτεύχθηκε και για τις τρεις αναλυόμενες ουσίες με την προσθήκη άλατος με περιεκτικότητα 30% στο δείγμα. Πιο συγκεκριμένα, η μικρότερη μεταβολή στην απόδοση της μεθόδου παρατηρείται για την ουσία 2,4-Διχλωροφαινόλη, ενώ για την ουσία 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη βλέπουμε μεγαλύτερη βελτίωση της απόδοσης με αντίστοιχη προσθήκη άλατος. Το ίδιο παρατηρείται και για

την ουσία 2,3,4,6–Τετραχλωροφαινόλη. Έτσι, επιλέγεται ως καταλληλότερο ποσοστό περιεκτικότητας του δείγματος σε αλάτι το 30 %.

3.7 Επιλογή θερμοκρασίας και χρόνου εκχύλισης

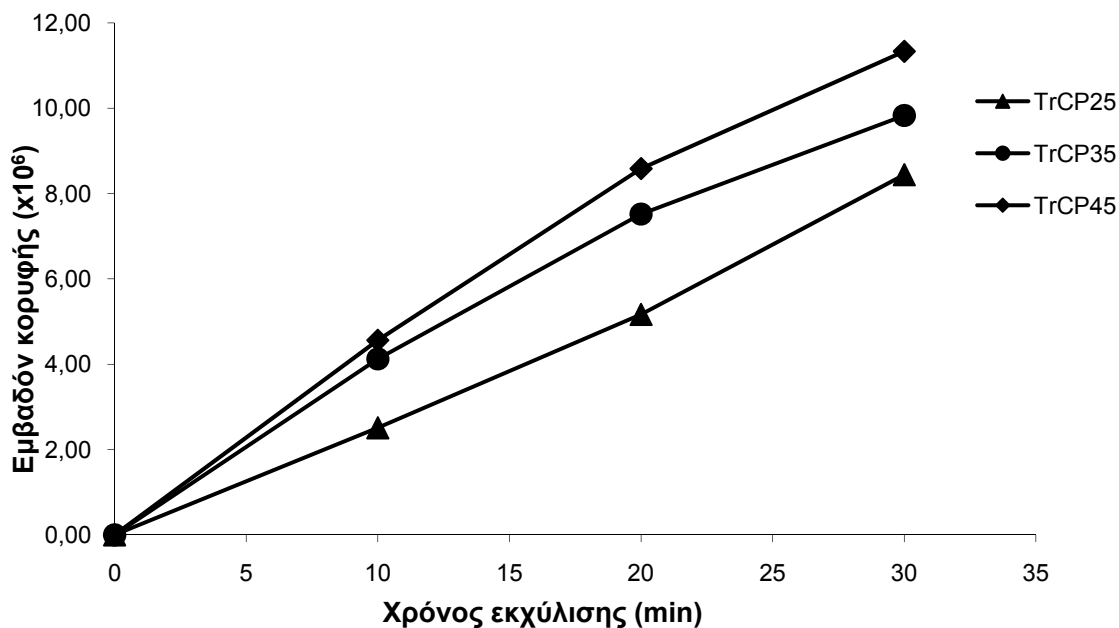
Στη συνέχεια, εξετάσθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης στην αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία αυτή από 25 °C έως 45 °C. Δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες εκχύλισης: 25 °C, 35 °C και 45 °C. Ταυτόχρονα, με τον έλεγχο της θερμοκρασίας εκχύλισης, μελετήθηκε και η αντίστοιχη επίδραση της μεταβολής του χρόνου εκχύλισης. Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σε τρεις διαφορετικούς χρόνους έκθεσης της ίνας στο δείγμα: στα 10 min, 20 min και 30 min. Οι συνθήκες στις οποίες έγιναν αυτές οι αναλύσεις είναι οι εξής: συνθήκες κενού αέρα, εισαγωγή 9 ml δείγματος σε απιονισμένο νερό με συγκέντρωση 120 ppt σε 2,4-Διχλωροφαινόλη, 20 ppt σε 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 40 ppt σε 2,3,4,6–Τετραχλωροφαινόλη, pH δείγματος ίσο με 4, 30% NaCl, χρόνος ανάδευσης 10 min με ταχύτητα ανάδευσης 160 rpm, δειγματοληψία χωρίς ανάδευση. Το Γράφημα 10 παρουσιάζει τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων για την ουσία 2,4–Διχλωροφαινόλη και στις τρεις θερμοκρασίες αυξάνοντας το χρόνο εκχύλισης.



Γράφημα 10: Επίδραση του χρόνου εκχύλισης σε θερμοκρασία 25 °C, 35 °C, 45 °C στην αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό κενό για την ουσία 2,4-Διχλωροφαινόλη

Παρατηρώντας το Γράφημα 10 επιβεβαιώνεται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης διευκολύνει την μετάβαση της ουσίας 2,4-Διχλωροφαινόλη από την υγρή στην αέρια φάση μέσα στο φιαλίδιο. Η μεγαλύτερη απορρόφηση της ουσίας από τους πόρους της ίνας πετυχαίνεται στη θερμοκρασία των 35°C, ενώ στη θερμοκρασία των 45°C παρατηρείται μείωση του αντίστοιχου σήματος. Όσον αφορά το χρόνο εκχύλισης, βλέπουμε ότι η απόκριση της ουσίας από τον αέριο χρωματογράφο αυξάνεται όσο αυξάνεται ο χρόνος έκθεσης της ίνας στο δείγμα και στις τρεις θερμοκρασίες. Οι μεγαλύτερες μεταβολές παρατηρούνται στις θερμοκρασίες των 25°C και 35°C, ενώ στους 45°C η ουσία φαίνεται να έρχεται σε ισορροπία μετά τα 30 min.

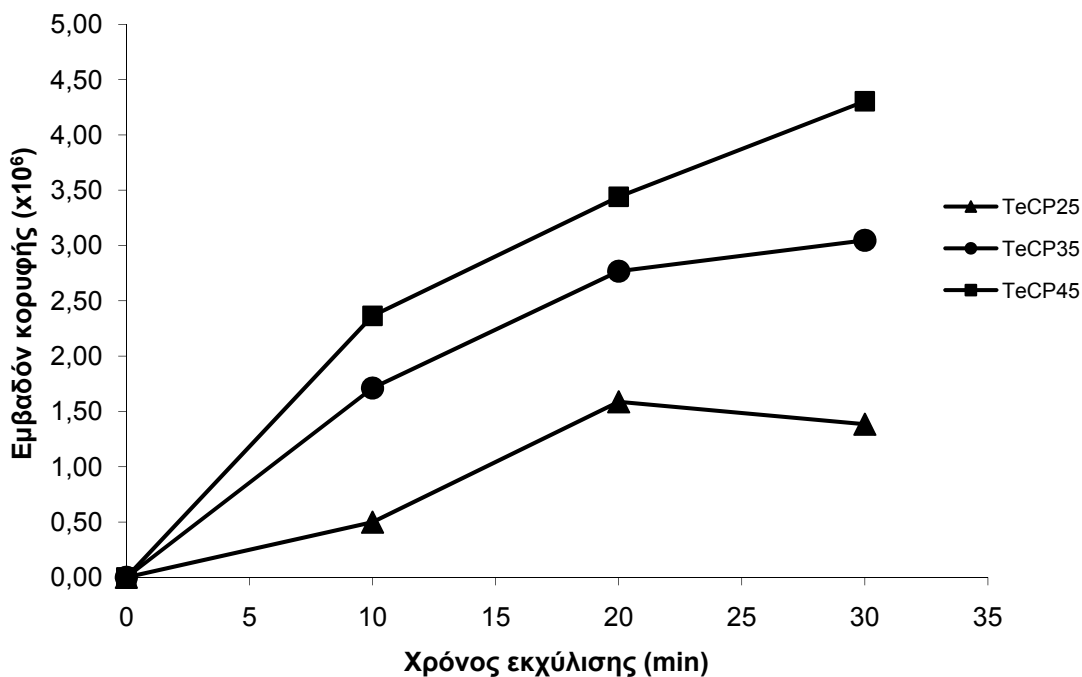
Στη συνέχεια, το Γράφημα 11 παρουσιάζει τα αποτελέσματα για την ουσία 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και στις τρεις θερμοκρασίες αυξάνοντας το χρόνο εκχύλισης.



Γράφημα 11: Επίδραση του χρόνου εκχύλισης σε θερμοκρασία 25 °C, 35 °C, 45 °C στην αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό κενό για την ουσία 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη

Όπως και παραπάνω με την ουσία 2,4-Διχλωροφαινόλη, η αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης διευκολύνει τη μετάβαση της ουσίας 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη από την υγρή στην αέρια φάση μέσα στο φιαλίδιο. Η μεγαλύτερη απόκριση της ουσίας από τον αέριο χρωματογράφο πετυχαίνεται στη θερμοκρασία των 45°C, αντίθετα με την ουσία 2,4-Διχλωροφαινόλη που στη θερμοκρασία των 45°C παρατηρήθηκε μείωση του σήματος της. Αυτό οφείλεται στη πτητικότητα των δύο ουσιών και στον αριθμό των ατόμων χλωρίου που περιέχουν. Όσον αφορά το χρόνο εκχύλισης, τα σήματα της ουσίας ενισχύονται όσο αυξάνεται ο χρόνος έκθεσης της ίνας στο δείγμα και στις τρεις θερμοκρασίες. Οι μεγαλύτερες αλλαγές παρουσιάζονται στις θερμοκρασίες των 25°C και 35°C. Μέχρι τα 30 min που εξετάστηκαν η ουσία δεν έχει έρθει ακόμα σε ισορροπία.

Ακολούθως, το Γράφημα 12 παρουσιάζει τα αποτελέσματα για την ουσία 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη και στις τρεις θερμοκρασίες αυξάνοντας το χρόνο εκχύλισης.



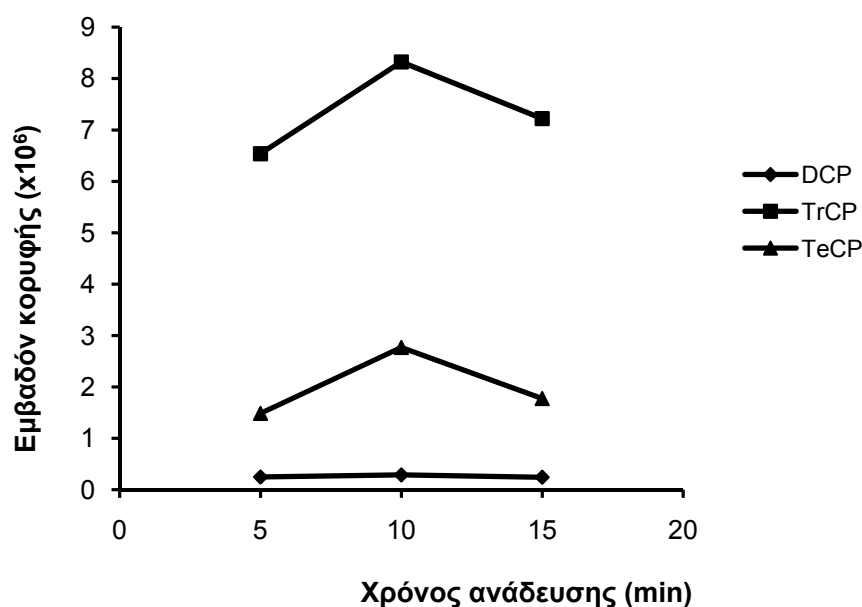
Γράφημα 12: Επίδραση του χρόνου εκχύλισης σε θερμοκρασία 25 °C, 35 °C, 45 °C στην αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό κενό για την ουσία 2,3,4,6–Τετραχλωροφαινόλη

Από το Γράφημα 12 παρατηρείται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης διευκολύνει τη μετάβαση και της ουσίας 2,3,4,6–Τετραχλωροφαινόλης από την υγρή στην αέρια φάση μέσα στο φιαλίδιο, όπως συνέβη και στις άλλες δύο ουσίες. Η μεγαλύτερη απόκριση της ουσίας από τον αέριο χρωματογράφο πετυχαίνεται στη θερμοκρασία των 45°C. Πετυχαίνεται σχεδόν τριπλασιασμός του σήματος με την αύξηση της θερμοκρασίας από 25°C σε 45°C. Σε σχέση με τις άλλες δύο ουσίες, εδώ παρουσιάζεται η μεγαλύτερη μεταβολή λόγω του ότι έχει τέσσερα άτομα χλωρίου και είναι λιγότερο πτητική από τις άλλες δύο ουσίες. Έτσι, η αύξηση της θερμοκρασίας τη διευκολύνει να μεταφερθεί στον υπερκείμενο αέρα του φιαλιδίου. Όσον αφορά το χρόνο εκχύλισης, η αποδοτικότητα της μεθόδου βελτιώνεται όσο αυξάνεται ο χρόνος έκθεσης της ίνας στο δείγμα και στις τρεις θερμοκρασίες. Οι μεγαλύτερες αλλαγές παρουσιάζονται στις θερμοκρασίες των 35°C και 45°C, ενώ στους 25°C η ουσία φαίνεται να έρχεται σε ισορροπία μετά τα 20 min.

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, λοιπόν, επιλέγονται οι 35°C ως καταλληλότερη θερμοκρασία εκχύλισης του δείγματος.

3.8 Επιλογή χρόνου ανάδευσης

Μια ακόμη παράμετρος που επηρεάζει την αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού είναι ο χρόνος ανάδευσης του δείγματος. Δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικοί χρόνοι ανάδευσης: 5 min, 10 min και 15 min. Οι συνθήκες στις οποίες έγιναν αυτές οι αναλύσεις είναι οι εξής: συνθήκες κενού αέρα, εισαγωγή 9 ml δείγματος σε απιονισμένο νερό με συγκέντρωση 120 ppt σε 2,4-Διχλωροφαινόλη, 20 ppt σε 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 40 ppt σε 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη, pH δείγματος ίσο με 4, 30% NaCl, ανάδευση με ταχύτητα ανάδευσης 160 rpm, χρόνος δειγματοληψίας 20 min χωρίς ανάδευση και θερμοκρασία εκχύλισης 35 °C. Τα αποτελέσματα που έδωσαν οι παραπάνω αναλύσεις παρουσιάζονται στο Γράφημα 13.



Γράφημα 13: Επίδραση του χρόνου ανάδευσης στην αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό κενό

Από το Γράφημα 13 παρατηρείται ότι ο χρόνος ανάδευσης του δείγματος πριν εκτεθεί η ίνα για δειγματοληψία επηρεάζει σημαντικά τη μετάβαση των ουσιών από την υγρή στην αέρια φάση μέσα στο φιαλίδιο. Όσον αφορά την ουσία 2,4-Διχλωροφαινόλη δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές, διότι είναι αρκετά πτητική ουσία και έρχεται σε ισορροπία μετά από τα 5 min ανάδευσης. Αντίθετα, οι ουσίες 2,4,6-Τριχλωροφαινόλη και 2,3,4,6-Τετραχλωροφαινόλη, που είναι λιγότερο πτητικές, παρουσιάζουν μεγάλες μεταβολές στην απόκρισή τους από τον αέριο χρωματογράφο. Στα 10 min ανάδευσης τα σήματά τους μεγιστοποιούνται, ενώ στα 15 min οι ουσίες αρχίζουν και εξατμίζονται από το δείγμα. Έτσι, εύλογα επιλέγεται ως καταλληλότερος χρόνος ανάδευσης του δείγματος τα 10 min.

4 Συμπεράσματα

Η παρούσα έρευνα ασχολήθηκε με τη βελτιστοποίηση της μεθόδου της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού, μεταβάλλοντας κάποιες παραμέτρους. Η χρήση της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού σε συνδυασμό με την ανάλυση μέσω αέριου χρωματογράφου επέτρεψε το γρήγορο και αποτελεσματικό διαχωρισμό των χλωροφαινολών σε υδατικά διαλύματα. Εξετάστηκαν διάφοροι παράμετροι, προκειμένου να γίνει αντιληπτό το πόσο επηρεάζεται η απορρόφηση των ουσιών από την ίνα μεταβάλλοντας τις τιμές των παραμέτρων αυτών. Πρώτα απ' όλα, επιλέχθηκε η ίνα PA ως η πιο αποτελεσματική και καταλληλότερη για την χρωματογραφική ανάλυση των χλωροφαινολών. Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι όσο αυξάνεται ο όγκος του δείγματος που αναλύεται, τόσο αυξάνονται και οι αντίστοιχες αποκρίσεις των ουσιών από τον αέριο χρωματογράφο. Μεταβάλλοντας τον όγκο του φιαλιδίου, στο οποίο εισάγεται το δείγμα, παρατηρείται ότι βελτιστοποιείται κατά πολύ το σήμα του αέριου χρωματογράφου και έτσι, προτείνεται για πρώτη φορά ο όγκος φιαλιδίου των 1000 ml για τέτοιου είδους αναλύσεις. Το pH, ακόμη, επιδρά σημαντικά στην αποδοτικότητα της μεθόδου μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού, καθώς παρατηρήθηκε πως το pH 4 αποτελεί ευνοϊκή συνθήκη για την ενίσχυση της απόκρισης των ουσιών, ενώ μεγαλύτερες τιμές αυτού επιφέρουν αντίστοιχη μείωση του σήματος. Επιπλέον, η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού επηρεάζεται άμεσα από την αλατότητα του δείγματος, καθώς παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη χλωριούχου νατρίου στο δείγμα προς ανάλυση, αυξάνει την απορρόφηση των ουσιών από την ίνα. Ακόμη, στην παρούσα έρευνα παρατηρήθηκε ότι αυξάνοντας τη θερμοκρασία εκχύλισης και το χρόνο που μένει εκτεθειμένη η ίνα στο δείγμα, ευνοείται σημαντικά η απορρόφηση των ουσιών κατά τη δειγματοληψία και βελτιστοποιούνται τα αποτελέσματα. Σχετικά μικροί χρόνοι ανάδευσης ενισχύουν, αν και όχι σημαντικά, την απόκριση του αέριου χρωματογράφου, καθώς παρατηρήθηκε ότι η ανάδευση του δείγματος προς ανάλυση για μεγάλο χρονικό διάστημα επιφέρει εξάτμιση των ουσιών. Τέλος, η ταχύτητα ανάδευσης του δείγματος

δείχνει να μην περιορίζει, αλλά ούτε ενισχύει σημαντικά την εκχύλιση των χλωροφαινολών.

Συμπερασματική, η έρευνα αυτή βοηθάει να γίνει αντιληπτό πως μεταβάλλοντας τις τιμές διάφορων παραμέτρων επιτεύχθηκε η βελτιστοποίηση της μεθόδου μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού, προκείμενου να επιτυγχάνεται η κατά το δυνατόν μεγαλύτερη αποδοτικότητα της μεθόδου.

5 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

Μέχρι σήμερα, έχουν γίνει κάποιες έρευνες που αφορούν το διαχωρισμό και προσδιορισμό των χλωροφαινολών χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης σε συνδυασμό με την ανάλυση μέσω αέριου χρωματογράφου. Για πρώτη φορά όμως, στην παρούσα εργασία, προτείνεται η μέθοδος μικροεκχύλισης στερεάς φάσης να πραγματοποιείται υπό συνθήκες κενού. Προκειμένου να μπορέσουμε να έχουμε μια όσο το δυνατόν πιο πλήρη εικόνα για την αποδοτικότητα αυτής της μεθόδου, προτείνεται η διεξαγωγή περαιτέρω πειραμάτων σε διάφορες μήτρες, είτε αυτά είναι υγρά δείγματα, είτε στερεά ή περιβαλλοντικά δείγματα. Επίσης, η διεξαγωγή πειραμάτων διαφορετικών ομάδων οργανικών ρύπων, στα οποία θα μεταβάλλονται οι παράμετροι που επηρεάζουν άμεσα τα αποτελέσματα της μεθόδου, πιθανώς να ενισχύσει την γνώση μας σχετικά με αυτή τη τόσο νέα, ακόμη, τεχνική μικροεκχύλισης και να μπορέσουν να δοθούν απαντήσεις σε πολλά ερωτήματα.

Συμπερασματικά, η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού έχει παρουσιαστεί σαν μία πολλά υποσχόμενη τεχνική εκχύλισης, καθιστώντας δυνατή την ανίχνευση μίας μεγάλης ποικιλίας από οργανικούς ρυπαντές σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού σε συνδυασμό με την αέρια χρωματογραφία προσφέρει μεγάλη ευαισθησία και ανοίγει νέες προοπτικές στις έρευνες για να ξεπεράσουν τους περιορισμούς που υφίστανται. Αυτή η απλή μέθοδος έχει πολλά περιθώρια βελτίωσης και θα δεχτεί μια ευρεία εφαρμογή στο μέλλον.

6 Βιβλιογραφία

1. M.N. Sarrion, F.J. Santos, M.T. Galceran, 'Determination of chlorophenols by solid - phase microextraction and liquid chromatography with electrochemical detection', Department of Quimica Analitica, Facultat de Quimica, Universitat de Barcelona, Marti i Franques 1-11, Spain, 08028 Barcelona, Journal of Chromatography A, 2002, 947 (155-165)
2. H.P. Ho, R.J. Lee, M.R. Lee, 'Purge – assisted headspace solid – phase microextraction combined with gas chromatography – mass spectrometry for determination of chlorophenols in aqueous samples', Department of Chemistry, National Chung Hsing University, Taiwan, Taichung 40227, Journal of Chromatography A, 2008, 1213 (245-248)
3. T. Gorecki and J. Pawliszyn, 'Effect of sample volume on quantitative analysis by solid phase microextraction – Part 1: Theoretical Considerations', Department of Chemistry and Waterloo Centre for Groundwater Research, University of Waterloo, Ontario, Canada N2L 3G1, Analyst, October 1997, 122 (1079-1086)
4. T. Gorecki, A. Khaled and J. Pawliszyn, 'The effect of sample volume on quantitative analysis by solid phase microextraction – Part 2: Experimental verification', Department of Chemistry, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada N2L 3G1, Analyst, 1998, 123 (2819-2824)
5. A. Penalver, E.Pocurull, F. Borrull, R.M. Marce, 'Trends in solid - phase microextraction for determining organic pollutants i environmental samples', Department of Quimica Analitica i Quimica

Organica, Universitat Rovira i Virgili, Spain, Imperial Tarraco 1, 43005 Tarragona, Trends in Analytical Chemistry, 1999, Vol. 18, No. 8

6. S. Lopez-Vidal, L. Arce, 'Optimisation of a Headspace Solid – Phase Micro - extraction Procedure for the Determination of 2,4,6 – Trichloroanisole and Various Related Compounds in Cork Washing Waste Water by Use of Gas Chromatography – Mass Spectrometry', *Chromatographia*, November 2005, 62 (527-531)
7. L. Maignial, P. Pibarot, G. Bonetti, A. Chaintreau and J.P. Marion, 'Simultaneous distillation - extraction under static vacuum: isolation of volatile compounds at room temperature', *Journal of Chromatography*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1992, 606 (87-94)
8. M.C. Quintana, L. Ramos, 'Sample preparation for the determination of chlorophenols', *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, Vol. 27, No. 5
9. J.L. Liao, C.M. Zeng, S. Hjertena and J. Pawliszyn, 'Solid Phase Micro Extraction of Biopolymers, Exemplified With Adsorption of Basic Proteins Onto a Fiber With Polyacrylic Acid', Department of Biochemistry, Uppsala University, Biomedical Center, P.O. Box 576
10. M. Portillo, N. Prohibas, V. Salvado, B.M. Simonet, 'Vial position in the determination of chlorophenols in water by solid phase microextraction', *Journal of Chromatography A*, 2006, 1103 (29-34)
11. A. Martinez - Urunuela, J.M. Gonzalez - Saiz, C. Pizarro, 'Multiple solid-phase microextraction in a non-equilibrium situation. Application in quantitative analysis of chlorophenols and chloroanisoles related to cork in wine', *Journal of Chromatography A*, 2005, 1089 (31-38)

12. J. Poerschmann, 'Sorption of Hydrophobic Organic Compounds on Nonpolar SPME Fibers and Dissolved Humic Organic Matter – Part III: Application of the Solubility Parameter Concept to Interpret Sorption on Solid Phase Microextraction (SPME) Fiber Coatings', UFZ – Center for Environmental Research Leipzig – Halle, Department of Remediation Research, Germany, Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig
13. T. Gorecki, X. Yu and J. Pawliszyn, 'Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres', Department of Chemistry and Waterloo Centre for Groundwater Research, University of Waterloo, Ontario, Canada N2L 3G1, *Analyst*, 1999, 124 (643-649)
14. <http://esc.syrres.com/interkow/webprop.exe>
15. <http://www.chem.uoa.gr/>
16. <http://chimikoergastirio.blogspot.com/>
17. <http://www.chromatography-online.org>
18. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc093.htm#SubSectionNumber:7.1.1>
19. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/519912/salting-out-effect>