

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Υγρή-υγρή μικροεκχύλιση του C₆₀ σε υδατικά δείγματα νερού υποβοηθούμενη από Vortex

ΠΕΛΟΥΜΠΗ ΕΝΕΪΝΤΑ

Εξεταστική Επιτροπή:

Ελευθερία Ψυλλάκη (επιβλέπουσα)

Καλογεράκης Νικόλαος

Λαζαρίδης Μιχαήλ

XANIA 2013

Πίνακας περιεχομένων

ΘΕΩ	ΩΡΗΤΙΚΟ	Ο ΜΕΡΟΣ	4
1.	. ΣΚΟ	ΟΠΟΣ	4
2.	. ΕΙΣ <i>Α</i>	λΓΩΓΗ	4
3.	Φ0	ΥΛΛΕΡΕΝΙΑ	5
	3.1.	Ιστορικά στοιχεία	5
	3.2.	Γενικοί Ορισμοί	7
	3.3.	Δομή φουλλερενίων	8
	3.4.	Φυσικές Ιδιότητες φουλλερενίων	9
	3.5.	Σύνθεση Φουλλερενίων	. 10
	3.6.	Ηλεκτροχημικές και Χημικές Ιδιότητες Φουλλερενίων	. 10
4.	. түх	Η ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΣΤΟ ΥΔΑΤΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	. 11
	4.1.	Τύχη και συμπεριφορά στο οικοσύστημα γλυκού νερού	. 12
	4.2.	Τύχη και συμπεριφορά στο θαλάσσιο οικοσύστημα	. 12
5.	. ΠΙΘ	ANOI MHXANIΣMOI THΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ $C_{60}.$. 14
	5.1.	Βλάβη στην ακεραιότητα της μεμβράνης	. 16
	5.2.	Βλάβες στα νουκλεϊκά οξέα	. 17
	5.3.	Βλάβη των κυττάρων μέσω αντιδραστικών ειδών οξυγόνου	. 18
	5.4.	Διακοπή της ενεργειακής μεταγωγής	. 18
	5.5.	Απελευθέρωση τοξικών συστατικών	. 18
6	. Mik	ΈΟΕΚΧΥΛΙΣΗ	. 19
	6.1. μικροι	Προτεινόμενη μέθοδος μικροεκχύλισης: Καινοτόμος μέθοδος υγρής-υγρής εκχύλισης υποβοηθούμενη από vortex	. 21
	 6.2.	Βελτιστοποίηση της μεθόδου. Παράμετροι που επηρεάζουν τη VALLME	. 23
7.	. ΧΡΩ	ΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	. 25
	7.1.	LC	. 25
ΠEIF	PAMAT	ΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	. 26
1.	. ΥΛΙΙ	KA	. 26
	1.1.	Αντιδραστήρια	. 26
	1.2.	Όργανα και Συσκευές	. 27
	1.3.	Χαρακτηριστικά Υδατικών Δειγμάτων	. 28
	1.4.	Χαρακτηριστικά Τολουολικών Δειγμάτων	. 30
2.	. ME	ΘΟΔΟΣ VALLME	. 30
3.	. ANA	ΑΛΥΣΕΙΣ ΜΕ LC- MS	. 31

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ			
1.	Επιλογή του οργανικού διαλύτη	32	
2.	Επιλογή του χρόνου ανάδευσης	33	
3.	Επιλογή της ταχύτητας ανάδευσης	33	
4.	Επιλογή του όγκου του οργανικού διαλύτη	34	
5.	Επιλογή του όγκου του υδατικού διαλύματος	35	
6.	Επίδραση του pH	36	
7.	Προσθήκη άλατος	36	
8.	Χρήση βέλτιστων συνθηκών	38	
9.	Περαιτέρω μελλοντικοί ερευνητικοί στόχοι	39	
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ			
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ			

1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο προσδιορισμός του C₆₀, που ανήκει στην κατηγορία των φουλλερενίων, το οποίο συναντάμε σε υδατικά περιβάλλοντα. Ως τέτοια πε

ριβάλλοντα μπορούν να θεωρηθούν τα νερά των ποταμών, η θάλασσα καθώς και το νερό που προορίζεται για οικιακή χρήση. Ο λόγος που κρίνεται επιτακτική η ανάγκη για τον προσδιορισμό του είναι ότι η ουσία αυτή ενδέχεται να έχει αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία διαφόρων έμβιων οργανισμών αλλά και στο περιβάλλον. Αυτό συμβαίνει για το λόγο ότι η συγκεκριμένη ουσία μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA και να επηρεάσει αρνητικά τις κυτταρικές δομές των έμβιων οργανισμών, μέσω της υπεροξείδωσης των λιπιδίων.

Έτσι λοιπόν, στηριζόμενοι στα παραπάνω, κρίνεται απαραίτητη η εύρεση μιας αποτελεσματικής μεθόδου η οποία θα είναι ικανή στο να προσδιοριστεί η εν λόγω ουσία στο υδατικό περιβάλλον. Στην παρούσα εργασία, προτείνεται μια μέθοδος η οποία στοχεύει κυρίως στην ελαχιστοποίηση του χρόνου προετοιμασίας του δείγματος καθώς και στην απλότητα της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθείται, δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση και στην αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα φουλλερένια αποτελούν αλλοτροπικές μορφές του άνθρακα, ανακαλύφθηκαν σχετικά πρόσφατα και κατατάσσονται στα νανοϋλικά. Ως νανοϋλικά, ορίζονται τα υλικά εκείνα των οποίων το μέγεθος των δομικών τους λίθων ανήκει στην τάξη του νανόμετρου. Η ιδιότητα των φουλλερενίων να αντιδρούν με άλλα στοιχεία ή χημικές ενώσεις, καθώς και η ικανότητά τους να ενσωματώνουν στο εσωτερικό τους

ετεροάτομα ή μόρια, σχετίζεται με πιθανή μελλοντική τους εφαρμογή ως φορέων στοχευμένης αποδέσμευσης δραστικών φαρμακευτικών μορίων, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις καρκίνου. Υπό μελέτη βρίσκεται και η εφαρμογή τους στη φωτοδυναμική αντιμετώπιση καρκινικών όγκων. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η προσθήκη λειτουργικών ομάδων στη επιφάνειά τους έχει οδηγήσει στη δημιουργία νέων υδατοδιαλυτών φουλλερενίων, τα οποία και συγκεντρώνουν έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον για πληθώρα βιολογικών δράσεων (αντικαρκινική, αντιβακτηριδιακή, αντι-ιική, αντιοξειδωτικά κ.ά.) ενώ ανοίγονται και προοπτικές για εφαρμογές τους στη διάγνωση παθολογικών καταστάσεων και στη χειρουργική^[1,5].



Σχήμα 1. Ενσωμάτωση μορίου στο εσωτερικό του C_{60}

3. ΦΟΥΛΛΕΡΕΝΙΑ

3.1. Ιστορικά στοιχεία

Η πρώτη επιβεβαίωση για την ύπαρξη των φουλλερενίων πραγματοποιήθηκε το 1985, μετά από μια σειρά πειραμάτων σχεδιασμένων για την προσομοίωση της δημιουργίας συσσωματωμάτων άνθρακα σε εστέρες. Οι Kroto και συν. ανακάλυψαν πως κατά την επίδραση μιας δέσμης laser ο γραφίτης εξαερώνεται με αποτέλεσμα τη δημιουργία μορίων αρκετά σταθερών που αποτελούνται από έναν μεγάλο αριθμό ατόμων άνθρακα (32-90). Το σταθερότερο από αυτά τα μόρια διαπιστώθηκε ότι αποτελείται

από 60 άτομα άνθρακα (C₆₀) και η δομή του θεωρήθηκε ότι μοιάζει με τη μορφή μιας μπάλας ποδοσφαίρου. Το μόριο αυτό ονομάστηκε buckyball ή buckminster fullerene από το όνομα του αρχιτέκτονα Buckminster Fuller που είχε κατασκευάσει παρόμοιες δομές σε στέγες κτιρίων^[1].

Η δεύτερη επιβεβαίωση που αποτέλεσε και επανάσταση για τη χημεία των φουλλερενίων ήρθε το 1990, όταν ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά μακροσκοπικές ποσότητες από buckyballs κατά την εξαέρωση γραφίτη με ηλεκτρικό τόξο. Με την παραπάνω μέθοδο, η διάλυση αιθάλης σε βενζόλιο οδήγησε στη δημιουργία ενός κιτρινωπού υγρού αποτελούμενο κατά 75% από μόρια C₆₀ και κατά 25% από μόρια C₇₀ και άλλα μεγαλύτερα φουλλερένια. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του μίγματος μέσω χρωματογραφικών μεθόδων ενώ μέσω φασματοσκοπίας επιβεβαιώθηκε η κλειστή δομή των μορίων και τα οποία αποτελούσαν νέα κρυσταλλική μορφή άνθρακα. Έτσι, αποδείχθηκε ότι τα φουλλερένια δεν είναι και τόσο σπάνια και ότι απαντούν στην αιθάλη αερίων και σε άλλες ουσίες που παράγονται από ατελείς καύσεις^[1].



Σχήμα 2. Δομή του φουλλερενίου C_{60}

3.2. Γενικοί Ορισμοί

Τα φουλλερένια αποτελούν αλλοτροπική μορφή άνθρακα, η τρίτη γνωστή μορφή καθαρού άνθρακα, μετά το γραφίτη και τον αδάμαντα. Είναι κλειστές, κοίλες αρωματικές ενώσεις που αποτελούνται από άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα (από 32 έως 600) κατανεμημένων έτσι ώστε να σχηματίζουν πενταγωνικές και εξαγωνικές έδρες. Οι κορυφές των εδρών αποτελούνται από άτομα C ενώ οι δεσμοί είναι οι ακμές. Εξαιτίας του γεγονότος ότι δεν υπάρχουν ελεύθερα σθένη, τα μόρια των φουλλερενίων έχουν μεγάλη φυσική και χημική σταθερότητα^[1].

Τα φουλλερένια αποτελούν δομές με ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Εμφανίζουν 3 είδη αξόνων συμμετρίας και 15 διαφορετικά επίπεδα συμμετρίας και επίσης το μόριο των φουλλερενίων παραμένει αναλλοίωτο κατά την αντιστροφή των αξόνων του συστήματος αναφοράς.

Κάθε άτομο άνθρακα στο μόριο των φουλλερενίων συνδέεται με τρία γειτονικά άτομα άνθρακα δεδομένου ότι είναι sp² υβριδισμού, κατά αντιστοιχία με την υποθετική δομή του γραφίτη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα υδατοδιαλυτά φουλλερένια τα οποία και φέρουν στην εξωτερική επιφάνειά τους πολικές ομάδες που μειώνουν τον υδρόφοβο χαρακτήρα τους. Επίσης, έχει πλέον αποδειχθεί ότι το αρχικά υδρόφοβο C₆₀, κατόπιν εκτεταμένης έκθεσης στο νερό, σχηματίζει υδατό-σταθερά συσσωματώματα τα οποία και είναι πολικής φύσεως. Για παράδειγμα, η υδατοδιαλυτότητα του C₆₀ στην υδρόφοβη κρυσταλλική του μορφή εκτιμάται ότι κυμαίνεται από 1,11^{-10⁻¹¹} M έως 1,8^{-10⁻²⁰} M στο νερό^[3,4]. Το στερεό C₆₀ μπορεί να διαλυθεί επίσης στο νερό μέσω ενός οργανικού διαλύτη (π.χ. τολουολίου) χρησιμοποιώντας υπέρηχους^[3]. Είναι σαφές ότι η μετάβαση του φουλλερενίου από υδρόφοβες σε πολικές μορφές έχει πιθανές επιπτώσεις στη μεταφορά, στο μετασχηματισμό και στις βιολογικές του επιδράσεις^[4].

Για την ονοματολογία των φουλλερενίων χρησιμοποιείται η αρίθμηση των ανθράκων μέσω ενός ήδη αριθμημένου πρότυπου σχήματος σύμφωνα με τις οδηγίες τις IUPAC. Έτσι για το C₆₀ χρησιμοποιείται η αρίθμηση που απεικονίζεται στο σχήμα 3.



Σχήμα 3. Πρότυπο σχήμα αρίθμησης του φουλλερενίου C_{60}

3.3. Δομή φουλλερενίων

Η προτεινόμενη δομή για το φουλλερένιο C_{60} είναι αυτή του κατατετμημένου (truncated) εικοσάεδρου. Κάθε κορυφή του κατατετμημένου εικοσάεδρου καταλαμβάνεται από ένα άτομο άνθρακα το οποίο συνδέεται με άλλα τρία άτομα άνθρακα με ένα διπλό δεσμό και δύο απλούς. Τα άτομα άνθρακα με αυτή τη συνδεσιμότητα χαρακτηρίζονται sp² υβριδισμένα καθώς τα τροχιακά που συνδέουν τα άτομα άνθρακα με σίγμα δεσμούς είναι υβριδικά του 2s και των δύο 2p τροχιακών (2px, 2py). Το 2pz τροχιακό είναι υπεύθυνο για τον π δεσμό^[2].

Το φουλλερένιο αποτελείται από 12 πεντάγωνα και 20 εξάγωνα. Σε συνθήκες ισορροπίας (geometry optimization) το φουλλερένιο έχει διάμετρο 0,68 nm και ακτίνα Wan Der Waals 1 nm. Το μήκος του δεσμού ανάμεσα σε δύο άτομα άνθρακα σε ένα εξάγωνο είναι 1,461 Å ενώ ανάμεσα σε δύο άτομα άνθρακα σε πεντάγωνο είναι 1,404 Å^[2].

Το φουλλερένιο C₆₀ σχηματίζει εδροκεντρωμένους κρυστάλλους με σταθερά πλέγματος 14,17 Å σε θερμοκρασίες άνω των 255 Κ. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες τα μόρια κρυσταλλώνονται σε απλό κυβικό κρύσταλλο^[2].

3.4. Φυσικές Ιδιότητες φουλλερενίων

Μέσα στο μόριο του C₆₀ έχει αποδειχθεί πειραματικά η ύπαρξη κοιλότητας μέσω της μιονικής ανάλυσης. Στη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής μιονικό υδρογόνο, όπου στον πυρήνα του αντί για πρωτόνιο έχει ένα μιόνιο με φορτίο +e και μάζα ίση με 200 φορές τη μάζα του ηλεκτρονίου. Έτσι λοιπόν, το μιονικό υδρογόνο τοποθετήθηκε σε «κλωβό φουλλερενίου» και με τη διαδικασία αυτή παρατηρήθηκε ότι οι ιδιότητες του έγκλειστου και του ελεύθερου μιονικού υδρογόνου ήταν ουσιαστικά οι ίδιες^[1].

Η σφαιρική μορφή του μορίου καθώς και ο προσδιορισμός της διαμέτρου του πραγματοποιήθηκε μέσω κρυσταλλογραφικής ανάλυσης ακτίνων X ή μέσω της σκέδασης νετρονίων ενός μοριακού κρυστάλλου. Ένα πολύ χαρακτηριστικό στοιχείο των μορίων αυτών είναι ότι δίνουν διαλύματα πολύ έντονου χρώματος. Το C₆₀ στο τολουόλιο για παράδειγμα δίνει στο διάλυμα ένα έντονο μωβ χρώμα ενώ στα υδατικά διαλύματα δίνει ένα πυρόξανθο χρώμα^[1].



Σχήμα 4. Υδατικά (πυρόξανθο) και τολουολικά (μωβ) διαλύματα του φουλλερενίου

C₆₀

~ 9 ~

3.5. Σύνθεση Φουλλερενίων

Όπως προαναφέρθηκε, τα φουλλερένια βρίσκονται μέσα στην αιθάλη που παράγεται από γραφίτη όταν αυτός ακτινοβολείται με laser ή με ηλεκτρικό τόξο, καθώς και από την ατελή καύση υδρογονανθράκων. Η πιο γνωστή μέθοδος σύνθεσης του φουλλερενίου C₆₀ είναι αυτή της εξαέρωσης του γραφίτη με ηλεκτρικό τόξο, η οποία αποδίδει φουλλερένια σε ποσοστό 3-11%, ενώ έχουν αναφερθεί και ποσοστά της τάξης του 44%. Η απομόνωση του φουλλερενίου πραγματοποιείται με την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη και εν συνεχεία κρυσταλλώνεται με καθαρότητα της τάξης του 98%. Για μεγαλύτερη καθαρότητα χρησιμοποιούνται χρωματογραφικές μέθοδοι. Τα φουλλερένια είναι γενικά σταθερά μόρια, ωστόσο, με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται μια αλλοίωση τόσο στα διαλύματά τους όσο και στην κρυσταλλική τους μορφή^[1].

3.6. Ηλεκτροχημικές και Χημικές Ιδιότητες Φουλλερενίων

Το φουλλερένιο C₆₀, έχει δυνατότητα απόδοσης έξι ηλεκτρονίων (C_{60}^{-6}) και η οξείδωσή του είναι μη αναστρέψιμη. Η ενέργεια πρώτου ιονισμού είναι μόνο 1,0 V γεγονός που αποδεικνύει τον ισχυρό ηλεκτρονιόφιλο χαρακτήρα του. Το φουλλερένιο C₆₀, λόγω του ηλεκτρονιόφιλου χαρακτήρα του, σχηματίζει άλατα με γενικό τύπο $[D]^{+}$ n $[C_{60}]^{-n}$. Επιπλέον δίνουν αντιδράσεις με ουδέτερους ακόρεστους υδρογονάνθρακες και αμίνες^[1].

Εξωεδρικά μεταλλικά παράγωγα δημιουργούνται από την αντίδραση του C_{60} με μεταλλικά ιόντα M^+ όπου M = Fe, Co, Ni, Cu, Rh, La. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ιδιότητες των μεταλλικών φουλλερενίων A_3C_{60} , όπου A = K, Rb, Cs, τα οποία σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι υπεραγώγιμα υλικά^[1]. Το φουλλερένιο C₆₀ δημιουργεί σύμπλοκα με πολλές κατηγορίες μορίων. Κλασικά σύμπλοκα συναρμογής δημιουργούνται με ασθενείς ηλεκτρονιοδότες όπως είναι το θείο και του τελλούριο. Τα φουλλερένια μπορούν να δώσουν αντιδράσεις προσθήκης που οδηγούν σε μείωση της ακορεστότητας των μορίων. Άλλες αντιδράσεις προσθήκης είναι με αλογόνα. Παρατηρούνται και οξείδια των φουλλερενίων καθώς και δημιουργία κετονικών ομάδων μετά από τη διάσπαση ενός δεσμού C-C και σπάσιμο του κλωβού^[1].

Επίσης, τα φουλλερένια αντιδρούν με οργανομεταλλικές ενώσεις και δημιουργούν ανιόντα της μορφής $[C_{60}R_N]^{-m}$. Η χημεία των αντιδράσεων με τις οργανομεταλλικές ενώσεις υπαγορεύεται από τη σφαιρική γεωμετρία των μορίων του φουλλερενίου και τον εντοπισμένο π-δεσμό. Τα οργανομεταλλικά παράγωγα δεν είναι αρκετά σταθερά λόγω της κυρτότητας του φουλλερενίου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης και η αντίδρασή τους με ελεύθερες ρίζες για να δώσουν $[C_{60}R]^{44}$.

4. ΤΥΧΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΣΤΟ ΥΔΑΤΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει επαρκής βιβλιογραφία για τις συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων σε φυσικά νερά και ιζήματα. Εκτός από τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στα φυσικά νερά και την προέλευσή τους, πρέπει επίσης να αναγνωριστούν και να ποσοτικοποιηθούν η συμπεριφορά τους, οι διαδικασίες μεταφοράς καθώς και οι βιολογικές αλληλεπιδράσεις τους. Επίσης, κρίνεται απαραίτητη η γνώση της κατανομής μεταξύ του πρωτογενούς σωματιδίου και του συσσωματώματος για όλα τα νανοσωματίδια, καθώς και η μορφή του συσσωματώματος^[4].

4.1. Τύχη και συμπεριφορά στο οικοσύστημα γλυκού νερού

Τα τελευταία χρόνια, μεγάλη συζήτηση έχει γίνει από την επιστημονική και όχι μόνο κοινότητα για τις φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων σε σχέση με τη συμπεριφορά τους σε φυσικά νερά. Επίσης, είναι καθολικά αποδεκτό ότι η συμπεριφορά τους αυτή εξαρτάται από: τη χημική τους σύνθεση, τη μάζα των σωματιδίων αυτών, τον αριθμό των σωματιδίων και τη συγκέντρωσή τους στα φυσικά νερά^[4].

Στις μέρες μας, η μέτρηση μερικών από αυτών των ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων, αποτελούν μετρήσεις ρουτίνας, ωστόσο, συχνά είναι δύσκολο να εξασφαλιστεί η ακρίβειά τους. Οι κατανομές μεγέθους των σωματιδίων αυτών στα φυσικά νερά, μπορεί να ποσοτικοποιηθούν μέσω δυναμικής σκέδασης φωτός καθώς και μέσω άλλων μεθόδων. Η ειδική τους επιφάνεια μπορεί να μετρηθεί μέσω της τεχνικής που ανέπτυξαν οι Brunaur, Emmett και Teller^[5], μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας ή μέσω περίθλασης ακτίνων Χ. Η διαλυτότητα των ανόργανων νανοσωματιδίων μπορεί να ποσοτικοποιηθεί χρησιμοποιώντας την τεχνική της υπερδιήθησης ακολουθούμενη από ICP-MS. Τόσο σε επίπεδο εργαστηριακών μετρήσεων, όσο και σε επίπεδο μετρήσεων στο πεδίο, είναι απαραίτητο να εξασφαλιστεί ότι αυτές οι ιδιότητες των νανοσωματιδίων που μετρήθηκαν είναι ρεαλιστικές^[4].

4.2. Τύχη και συμπεριφορά στο θαλάσσιο οικοσύστημα

Το θαλάσσιο περιβάλλον είναι γενικά πιο αλκαλικό σε σχέση με τα γλυκά νερά, έχει υψηλότερη ιοντική ισχύ και εμφανίζει μεγάλη ποικιλία από κολλοειδή και φυσική οργανική ύλη. Η παράκτια απορροή και η ατμοσφαιρική εναπόθεση θα μπορούσε να συμβάλει στη μόλυνση του θαλάσσιου περιβάλλοντος. Στις παράκτιες περιοχές, οι τύποι της οργανικής ύλης στο νερό ποικίλουν ανάλογα με τις διάχυτες εισροές και το είδος των απορρίψεων, αν και θα περίμενε κανείς υψηλότερες συγκεντρώσεις

οργανικής ύλης στην παράκτια ζώνη σε σύγκριση με ένα παρθένο ωκεάνιο δείγμα νερού^[11-13]. Επίσης, τα νερά των ωκεανών παρουσιάζουν αλλαγές στα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά ανάλογα με το βάθος, το οποίο μπορεί να επηρεάσει τη συσσωμάτωση και κολλοειδή κατάσταση της χημείας τουσ. Για παράδειγμα, η θερμοκρασία είναι γνωστό ότι αλλάζει με το βάθος, με αποτέλεσμα να γίνεται διαστρωμάτωση του ρεύματος με το βάθος, η οποία και οδηγεί στην παρουσία διαφορετικών τύπων αλατότητας και οργανικής ύλης^[13]. Όπως γίνεται και στα γλυκά νερά, τα αδρανή υλικά των νανοσωματιδίων βυθίζονται πολύ αργά στον πυθμένα του ωκεανού χωρίς ωστόσο να είναι σαφές εάν τα σωματίδια αυτά θα συσσωρεύονται στο σημείο διεπαφής μεταξύ κρύου και ζεστού ρεύματος ή εάν ανακυκλώνονται με τους ζώντες οργανισμούς. Και οι δύο αυτές διεργασίες μπορεί να περιέχουν κίνδυνο για τα πελαγικά είδη που τρέφονται από αυτές τις ζώνες (όπως οι κάθετες μεταναστεύσεις τόνου), ενώ η εναπόθεση στα ιζήματα ενδέχεται να παρουσιάσει κίνδυνο έκθεσης σε βενθικά είδη. Κίνδυνος μπορεί επίσης να παρουσιαστεί από τα νανοσωματίδια που συσσωρεύονται στις μικροεπιφάνειες των ωκεανών, όπου οι παχύρρευστες και επιφανειακές ιδιότητες της τάσης θα μπορούσαν να παγιδεύσουν τα νανοσωματίδια στη μικροστιβάδα της επιφάνειας των ωκεανών^[14,15]. Τα νανοσωματίδια σε αυτή τη μικροστιβαδιακή επιφάνεια θα παρουσιάσουν πιθανώς μια διαδρομή αερολύματος, που θα οδηγεί σε κίνδυνο έκθεσης για τα θαλάσσια πουλιά και τα θηλαστικά, καθώς και τους οργανισμούς που ζουν στη μικροστιβάδα της επιφάνειας^[4].

Μέχρι σήμερα, λίγες συστηματικές μελέτες έχουν ερευνήσει το πώς οι αλλαγές στους αβιοτικούς παραγόντες όπως το pH ή την ιοντική ισχύ μπορούν να επηρεάσουν τα ύδατα. Ωστόσο, μερικές χημικές συμπεριφορές των νανοσωματιδίων μπορούν να μετρηθούν. Η υψηλή ιοντική ισχύς του θαλασσινού νερού σε σύγκριση με αυτήν του γλυκού νερού τείνει να προκαλέσει συσσωμάτωση των σωματιδίων αυτών. Πειραματικά στοιχεία της κολλοειδούς χημείας σε αλατούχες συνθήκες δείχνουν ότι ακόμα και μικρές αυξήσεις της αλατότητας πάνω από εκείνη του γλυκού νερού (2,5 ‰), μπορεί να μειώσει δραματικά τις συγκεντρώσεις κολλοειδών από τις διαδικασίες συσσωμάτωσης και καθίζησης^[10]. Στις περισσότερες εκβολές των ποταμών μια μικρή αλλαγή στην αλατότητα και μόνο θα έχει μικρή βιολογική επίδραση αλλά η μελέτη της χημείας προβλέπει την ταχεία απώλεια των κολλοειδών από το γλυκό νερό μόλις εισέρχονται στη ζώνη των εκβολών ποταμών. Η τοξικότητα και η συμπεριφορά των νανοσωματιδίων, ακόμη και σε πολύ αραιό θαλασσινό νερό, ενδέχεται να είναι πολύ διαφορετική από αυτή του γλυκού νερού. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι οργανισμοί που ζουν στις εκβολές αυτές μπορεί να διατρέχουν ιδιαίτερο κίνδυνο λόγω της πιθανότητας αυτών των σωματιδίων να συσσωματώνονται και να εναποτίθενται^[4].

Η συσσωμάτωση και η καθίζηση των ανθρωπογενών νανοσωματιδίων στο θαλασσινό νερό θα έχει ως αποτέλεσμα την απόθεση των σωματιδίων αυτών στα ιζήματα, με επακόλουθη έκθεση στους οργανισμούς που ζουν στους συγκεκριμένους υγροβιότοπους. Θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι αυτή η συμπεριφορά μπορεί να περιορίσει τη διασπορά των επεξεργασμένων νανοσωματιδίων στο θαλάσσιο περιβάλλον. Ωστόσο, αυτό μπορεί να είναι μια ψεύτικη λογική, επειδή σε νανοκλίμακα τα σωματίδια υπόκεινται σε γεωχημικές διεργασίες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην παγκόσμια διασπορά του υλικού. Ως εκ τούτου, δε θα πρέπει να θεωρηθεί ότι η επεξεργασία των νανοσωματιδίων στα θαλάσσια συστήματα είναι ίδια με εκείνη των μεγαλύτερων σωματιδίων^[4].

5. ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ C₆₀

Ελάχιστες είναι οι ποσοτικές έρευνες που έχουν δημοσιευθεί για την πρόσληψη και τη συσσώρευση των νανοσωματιδίων σε ολόκληρους οργανισμούς. Είναι σαφές, ότι οι οργανισμοί που ζουν σε περιβάλλοντα που περιέχουν νανοσωματίδια θα ενσωματώσουν τα σωματίδια αυτά μέσα στο σώμα τους, κυρίως μέσω του εντέρου ^[16-18] το οποίο έχει τη δυνατότητα, εν συνεχεία, μετατόπισής τους μέσα στο σώμα. Οι περισσότερες από τις αρχικές εργασίες στον τομέα αυτό έχουν πραγματοποιηθεί σε πρότυπα ζωικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται στην οικοτοξικολογία μιας και έχουν μελετηθεί διεξοδικά και μπορούν να παρατηρηθούν ολόκληρα σε κανονικά οπτικά μικροσκόπια. Οι Fernandes και συν. έχουν αποδείξει την πρόσληψη των φθορίζοντων καρβοξυλικών νανοσωματιδίων με *Daphnia magna* και μετατόπιση από το έντερο στα αποθέματα σταγόνων λίπους. Ο μηχανισμός με τον οποίο πραγματοποιείται η εν λόγω πρόσληψη και η σημασία της εξακολουθούν να είναι το επίκεντρο της έρευνας. Τα νανοσωματίδια μπορεί να εισχωρήσουν στα κύτταρα με διάχυση μέσω των κυτταρικών μεμβρανών καθώς και μέσω ενδοκυττάρωσης^[19]. Μερικά νανοσωματίδια, όπως οι κβαντικές κουκίδες και CNTs (Carbon NanoTubes), είναι εκ προθέσεως σχεδιασμένα έτσι ώστε να αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα ή τις κυτταρικές μεμβράνες για σήμανση ή για λόγους χορήγησης φαρμάκων^[20,21]. Επιπλέον, τα βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μεταφέρουν τα νανοσωματίδια^[22]. Εντούτοις, οι ακούσιες αλληλεπιδράσεις είναι και οι πιο σχετικές με τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις για το λόγο του ότι δεν ελέγχονται και θα μπορούσαν να επηρεάσουν αρνητικά τους ζώντες οργανισμούς^[4].

Αν και οι μηχανισμοί τοξικότητας δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί πλήρως, για τα περισσότερα νανοσωματίδια, οι πιθανοί μηχανισμοί που καθιστούν τοξικά τα συγκεκριμένα σωματίδια περιλαμβάνουν: διατάραξη των μεμβρανών ή του δυναμικού της μεμβράνης, οξείδωση των πρωτεϊνών, γενοτοξικότητα, διακοπή της κυκλοφορίας της ενέργειας, δημιουργία αντιδραστικών ειδών με το οξυγόνο (Reactive Oxygen Species, ROS) και την απελευθέρωση τοξικών συστατικών. Σε ορισμένες εφαρμογές ο μηγανισμός της τοξικότητας συνδέεται με τη χρησιμότητα των νανοσωματιδίων. Ωστόσο, οι ακούσιοι μηχανισμοί τοξικότητας μπορεί να είναι δύσκολο να απομονωθούν και να διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό ακόμη και για νανοσωματίδια της ίδια κατηγορίας όπως στην περίπτωση των φουλλερενίων ή των νανοσωματιδίων αργύρου. Για παράδειγμα, το fullerol $(C_{60}[OH]_x)$, το οποίο είναι η υδροξυλιωμένη μορφή του C_{60}) παράγει μονήρες οξυγόνο και έγει τη δυνατότητα να συμπεριφέρεται ως ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας σε βιολογικά συστήματα, χωρίς ωστόσο να είναι σημαντικά κυτταροτοξική^[4,23]. Επίστρωση του C_{60} με πολυβινυλοπυρρολιδόνη παράγει ένα νανοσωματίδιο που δημιουργεί μονήρες οξυγόνο το οποίο είναι ικανό να προκαλέσει υπεροξείδωση των λιπιδίων και άλλες βλάβες στα κύτταρα^[24]. Επίσης, άλλες μελέτες με υδατικά διαλύματα φουλλερενίων (nC_{60}) έδειξαν αντιβακτηριδιακή δραστηριότητα απουσία του φωτός ή οξυγόνου, αναιρώντας την αποκλειστική επίδραση της μονήρους οξυγόνου^[25]. Ομοίως, τα νανοσωματίδια από ασήμι, μπορεί να προκαλέσουν τοξικότητα μέσω πολλαπλών μηγανισμών. Οι Morones και συν. ανέφεραν πολλές πιθανές αιτίες: τα νανοσωματίδια που προέρχονται από το ασήμι προσκολλώνται στην επιφάνεια της μεμβράνης μεταβάλλοντας έτσι τις ιδιότητές της. Αυτό έχει σαν συνέπεια να επηρεάζεται η διαπερατότητα της μεμβράνης και η αναπνοή του κυττάρου. Επίσης μπορεί να διεισδύσουν στο εσωτερικό των βακτηρίων προκαλώντας βλάβες στο DNA και μπορούν να απελευθερώσουν τοξικά ιόντα Ag⁺. Έχει επίσης αναφερθεί αποικοδόμηση των μορίων του λιποπολυσακχαρίτη, σχηματίζοντας λάκκους στη μεμβράνη και αλλαγές στην διαπερατότητά της λόγω του νανοαργύρου^[4,27].

5.1. Βλάβη στην ακεραιότητα της μεμβράνης

Η κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων είναι ένα ημιπερατό φράγμα που εξυπηρετεί σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως η ρύθμιση της μεταφοράς υλικών, μεταφορά της ενέργειας στο εσωτερικό του κυττάρου, και την ενδοκυττάρια επικοινωνία. Οι περισσότερες εφαρμογές των νανοσωματιδίων έχουν ως στόχο την κυτταρική μεμβράνη δεδομένου ότι είναι η περιοχή στην οποία ένα κύτταρο είναι πιο εύκολο να επισημανθεί^[28]. Ενώ έχουν αναφερθεί να εισέρχονται σε βακτηριακά κύτταρα κβαντικές τελείες μικρότερες των 5 nm ή νανοσωματίδια αργύρου μικρότερα από 80 nm^[29,30], ωστόσο, είναι απίθανο ότι τα βακτήρια μπορούν να αφομοιώσουν μεγαλύτερα νανοσωματίδια. Εν τούτοις, έχει αποδειχθεί ότι ορισμένα νανοσωματίδια προσκολλώνται στην κυτταρική επιφάνεια με αποτέλεσμα να θέτουν σε κίνδυνο την ακεραιότητα και τις λειτουργίες της κυτταρικής μεμβράνης. Για παράδειγμα, τα νανοσωματιδια που προέργονται από το πυρίτιο και παράγωγα των φουλλερενίων έχουν την ικανότητα να ενσωματώνονται στις μεμβράνες των κυττάρων^[31]. Το καρβοξυλο-φουλλερένιο, το οποίο ενσωματώθηκε σε ένα βακτηριακό στέλεγος gramθετικό, προκάλεσε διάτρηση της βακτηριακής κυτταρικής του μεμβράνης, το οποίο είχε ως αποτέλεσμα τον θάνατο του κυττάρου^[32]. Ένα άλλο παράδειγμα αποτελούν τα νανοσωματίδια του χρυσού τα οποία όπως έχει αναφερθεί, αποδυναμώνουν τις μεμβράνες των κυττάρων και προκαλούν αποκρίσεις θερμικού σοκ στην E. coli^[4,33].

Τα νανοϋλικά μπορούν επίσης να προκαλέσουν βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης έμμεσα μέσω της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου, τα οποία μπορεί να οξειδώσουν τους διπλούς δεσμούς στις έλικες του λιπαρού οξέος της μεμβράνης των φωσφολιπιδίων σε μια διαδικασία γνωστή ως υπεροξείδωση των λιπιδίων. Αυτό αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης και τη ρευστότητα που κάνει τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στην ωσμωτική πίεση ή να παρεμποδίζουν την πρόσληψη των θρεπτικών συστατικών^[4,34].

5.2. Βλάβες στα νουκλεϊκά οξέα

Οι αλληλεπιδράσεις των νανοσωματιδίων με τα νουκλεϊκά οξέα βρίσκουν εφαρμογές στην επισήμανση του DNA ή διάσπασή του. Τα νουκλεοτίδια μπορούν να επισημανθούν με νανοσωματίδια, όπως και οι κβαντικές τελείες^[35-37]. Τα νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου μπορούν να τροποποιηθούν σε μη ιικούς φορείς και να μεταφέρουν γενετικές πληροφορίες στο εσωτερικό του κυττάρου όπως και στην περίπτωση των νανοσωματιδίων που κατασκευάζονται για να διασχίσουν την κυτταρική μεμβράνη^[38]. Σε αντίθεση με τις επωφελείς εφαρμογές της σύζευξης των νανοσωματιδίων που κλώνου, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα να επηρεάζονται αρνητικά η σταθερότητα και η λειτουργία του μορίου^[39,40]. Επίσης, τα φωτοευαίσθητα φουλλερένια μπορούν να διασπάσουν το DNA κατά την έκθεση στο φως, αν και αυτό εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από τον τύπο του παραγώγου φουλλερενίου^[4,41].

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί πάνω σε θηλαστικά για την καρκινογένεση από τα νανοσωματίδια έχουν επικεντρωθεί στον πνεύμονα και το σύνολο του αναπνευστικού συστήματος. Επίσης, είναι πιθανό τα νανοσωματίδια να μπορούν να επηρεάσουν το σχηματισμό όγκων από τη βλάβη που προκαλούν στο DNA και να αυξάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων που σχετίζονται με την φλεγμονή^[4]. Δεδομένου ότι η συγκεκριμένη έρευνα έχει επικεντρωθεί στον πνεύμονα, δεν είναι σαφές ακόμα κατά πόσο θα εφαρμόζεται σε άλλους ιστούς και όργανα^[4].

5.3. Βλάβη των κυττάρων μέσω αντιδραστικών ειδών οξυγόνου

Πολλές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με τα νανοσωματίδια έχουν αποδόσει την τοξικότητα των σωματιδίων αυτών στην παραγωγή ROS. Είναι γνωστό ότι τα ROS είναι σε θέση να βλάψουν κάθε συστατικό των κυττάρων, μιας και η αλληλεπίδραση αυτή τείνει να προκαλέσει περαιτέρω ρίζες. Ενώ είναι άμεσα διαθέσιμές αρκετές δοκιμασίες για να δοκιμαστούν η παρουσία των ROS καθώς και οι ζημιές που αυτές προκαλούν στα κύτταρα αυτές πρέπει να αξιολογούνται προσεκτικά για αποφυγή εσφαλμένων ενδείξεων που οφείλονται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νανοσωματιδίων και των αντιδραστηρίων ανίγνευσης^[4,42,43].

5.4. Διακοπή της ενεργειακής μεταγωγής

Οι διαδικασίες της μεταφοράς της ενέργειας και του ηλεκτρονίου φωσφορυλίωσης μπορεί να διακοπούν αν βρίσκεται σε κίνδυνο η ακεραιότητα της μεμβράνης. Έχει αναφερθεί ότι τα παράγωγα των φουλλερενίων αναστέλλουν την αναπνοή της γλυκόζης στην *E. coli*^[44,45]. Τα νανοσωματίδια του διοξειδίου του δημητρίου μπορούν να μετασχηματισθούν, μετά την επαφή τους με ζωντανά κύτταρα, και να προκαλέσουν οξείδωση των συστατικών της μεμβράνης που εμπλέκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων προκαλώντας έτσι κυτταροτοξικότητα^[4,46].

5.5. Απελευθέρωση τοξικών συστατικών

Ορισμένα νανοσωματίδια προκαλούν τοξικότητα σε βακτηριακά κύτταρα κατά την απελευθέρωση βλαβερών συστατικών, όπως είναι τα βαρέα μέταλλα ή τα ιόντα. Οι κβαντικές τελείες είναι ημιαγωγοί νανοκρυστάλλων που περιέχουν ευγενή μέταλλα ή μέταλλα μετάπτωσης όπως CdSe, CdTe, CdSeTe, ZnSe, InAs ή PbSe στο πυρήνα

τους, CdS και ZnS στο κέλυφός τους και μια οργανική επίστρωση^[47,48]. Επίσης, εκτός από τα μέταλλα του πυρήνα/κελύφους, ορισμένες οργανικές επικαλύψεις μπορεί να είναι τοξικές^[49]. Απελευθέρωση ιόντων αργύρου από τα νανοσωματίδια του αργύρου έχει επίσης αποδειχθεί ότι είναι τοξικά αφού πιστεύεται ότι τα ιόντα αργύρου αλληλεπιδρούν με τις ομάδες θειόλης των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση των ζωτικών ενζύμων^[50]. Τα ιόντα αργύρου έχει επίσης αποδειχθεί ότι εμποδίζουν την αντιγραφή του DNA^[51] και επηρεάζουν τη δομή και την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης^[4,51].

Τέλος, τα νανοσωματίδια του αλουμινίου έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη των ριζών των φυτών. Σωματίδια με μέγεθος 13 nm αποδείχθηκε ότι κατέστειλαν την ανάπτυξη της ρίζας σε πέντε διαφορετικά είδη φυτών σε συγκεντρώσεις 2 mg/mL, ενώ τα μεγαλύτερα μεγέθη, με εύρος από τα 200 έως τα 300 nm έδειξε ότι δεν είχαν καμία επίδραση[4,52].

6. ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ

Η ανάγκη για την εύρεση πιο γρήγορων και φθηνών τεχνικών εκχύλισης των ουσιών για το υπό εξέταση δείγμα οδήγησε στην ανάπτυξη των τεχνικών της μικροεκχύλισης. Οι τεχνικές μικροεκχύλισης μπορούν να θεωρηθούν ως μη διεξοδικές μέθοδοι προετοιμασίας του δείγματος, οι οποίες βασίζονται στη χρήση ενός πολύ μικρού όγκου από το εκχυλιστικό μέσο, συγκρινόμενες ως προς τον όγκο του δείγματος. Χαρακτηρίζονται δε από τη βαρυσήμαντη συμβολή τους στη βελτίωση της απόδοσης ως προς την προετοιμασία του δείγματος, υιοθετώντας μια απλή και χρονικώς αποδοτική προσέγγιση. Παρά τις διάφορες τεχνικές μικροεκχύλισης που έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία, η εμφάνιση της Μικροεκχύλισης Στερεής Φάσης (Solid-Phase Microextraction, SPME) το 1990 αποτέλεσε σημείο αναφοράς. Η βιομηχανική διάδοση της τεχνικής SPME σηματοδότησε την απαρχή μιας έντονης ερευνητικής δραστηριότητας στο πεδίο αυτό. Με το πέρας ορισμένων ετών, προτάθηκε στη βιβλιογραφία η μικροεκχύλιση με διαλύτη, γνωστή και ως Μικροεκχύλιση Υγρής Φάσης (Liquid-Phase Microextraction, LPME). Η καινοτομία της τεχνικής LPME έγκειται στο γεγονός ότι στοχεύει στην ελαχιστοποίηση της παραδοσιακής Υγρής – Υγρής Εκχύλισης, το οποίο και έχει σαν αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του λόγου των όγκων της φάσης του δέκτη προς τη φάση του δότη. Τα κυριότερα πλεονεκτήματά της τεχνικής LPME είναι ότι συνδυάζει ταχύτητα, απλότητα, χαμηλό κόστος και είναι φιλική προς το περιβάλλον. Επιπλέον, με την τεχνική αυτή καθίσταται πλέον δυνατή η ανάλυση ρυπαντών σε πραγματικά περιβαλλοντικά δείγματα όπου συνήθως απαντούν σε ίχνη ή βρίσκονται διαλυμένα σε αυτά^[6].

Για την εφαρμογή της παραπάνω τεχνικής, μία σταγόνα από ένα μη υδατοδιαλυτό οργανικό διαλύτη αιωρούμενη από τη μύτη μίας μικροσύριγγας χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των κύριων ενώσεων από υδατικό δείγμα και η μέθοδος ονομάστηκε Μικροεκχύλιση Μονής. Σταγόνας (Single-Drop Microextraction, SDME). Αυτή η βασική μεθοδολογία αναπτύχθηκε περαιτέρω και έκτοτε διάφορες πειραματικές προσεγγίσεις υιοθετήθηκαν. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η δυνατότητα γρήσης των μικροσταγόνων για την εκγύλιση των κύριων ενώσεων από υδατικά διαλύματα. Η πρώτη προσέγγιση που ακολούθησε τη μέθοδο αυτή ονομάστηκε Μικροεκχύλιση Απευθείας Αιωρούμενου Σταγονιδίου (Directly Suspended Droplet Microextraction, DSDME), όπου η ανάδευση του μίγματος που περιείχε το υδατικό δείγμα και την οργανική φάση δέκτη παρήγαγε ένα συμμετρικά περιστρεφόμενο πεδίο γύρω από τον συμμετρικό άξονα του μικροσταγονιδίου. Παρά το γεγονός ότι η μικροσταγόνα αφέθηκε ελεύθερη στο υδατικό δείγμα εξακολουθούσε να υφίσταται στη μορφή μονής σταγόνας. Μετα το πέρας ενός προκαθορισμένου χρονικού διαστήματος η οργανική φάση δέκτης της προς μελέτη ουσίας ανακτήθηκε με τη βοήθεια μικροσύριγγας και εν συνεχεία χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση. Σε μια πιο πρόσφατη εργασία, σε μίγμα αποτελούμενο από δείγμα ουρίνης και τολουολίου σαν φάση δέκτης εφαρμόστηκε φυγοκέντρηση αντί ανάδευσης, επιτρέποντας έτσι τη διάχυση των κύριων ενώσεων εντός της οργανικής φάσης δέκτη. Πρόσφατα προτάθηκε μια ελαφριά παραλλαγή της πιο πάνω μεθόδου υπό την ονομασία Υγρή -Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME). Σε αυτή την παραλλαγή ένας μη υδατοδιαλυτός διαλύτης διασκορπίσματος καθώς και μία οργανική φάση εγχύθηκαν στο διάλυμα δημιουργώντας ένα θολό διάλυμα. Στη συνέχεια το μίγμα υπέστη φυγοκέντρηση με αποτέλεσμα τα διασπαρμένα σωματίδια να καθιζάνουν στη βάση του κωνικού φιαλιδίου. Εν κατακλείδι, μια νέα μέθοδος μικροεκχύλισης μονής σταγόνας προτάθηκε, βασισμένη στη στερεοποίηση της επιπλέουσας μικροσταγόνας. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, το φιαλίδιο που περιέχει το υδατικό δείγμα και την οργανική μικροσταγόνα μεταφέρεται σε λουτρό πάγου. Με το πέρασμα ενός σύντομου χρονικού διαστήματος ο οργανικός διαλύτης στερεοποιείται και μεταφέρεται σε ένα μικρό κωνικό φιαλίδιο με τη βοήθεια μιας μικρής σπάτουλας. Τελικώς, ο στερεοποιημένος οργανικός διαλύτης τήκεται ταχύτατα υπό θερμοκρασία δωματίου και λαμβάνεται αντιπροσωπευτικό δείγμα προς ανάλυση^[6].

6.1. Προτεινόμενη μέθοδος μικροεκχύλισης: Καινοτόμος μέθοδος υγρής-υγρής μικροεκχύλισης υποβοηθούμενη από vortex

Στην παρούσα εργασία γίνεται εφαρμογή μιας μεθόδου μικροεκχύλισης η οποία ονομάζεται υγρή-υγρή μικροεκχύλιση υποβοηθούμενη από vortex (Vortex Assisted Liquid-Liquid MicroExtraction, VALLME) (εικόνα 5). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή η ουσία εκχυλίζεται από την υδατική φάση κατευθείαν μέσα στην οργανική φάση. Η συγκεκριμένη μέθοδος αποδείχθηκε γρήγορη τόσο στον χρόνο ανάλυσης όσο και στον χρόνο προετοιμασίας του προς ανάλυση δείγματος, που στην προκειμένη περίπτωση το προς ανάλυση δείγμα ήταν υδατικό διάλυμα του φουλλερενίου C₆₀, απλή στην εφαρμογή και ευαίσθητη. Παρόλο που έχουν γίνει έρευνες στο παρελθόν για την ανάλυση της συγκεκριμένης ουσίας και οι οποίες απαιτούσαν μεγαλύτερο όγκο οργανικής φάσης-δέκτη της ουσίας^[3], το βασικό πλεονέκτημα της παρούσας εργασίας είναι ότι η ισορροπία αποκαθίσταται εντός μερικών λεπτών αυξάνοντας επομένως την ακρίβεια και την ευαισθησία μειώνοντας ταυτόχρονα και το συνολικό χρόνο προετοιμασίας του δείγματος. Σύμφωνα με τη μέθοδο FDME μία μικροσταγόνα ενός μη υδατοδιαλυτού οργανικού διαλύτη μένει ελεύθερη σε ορισμένο όγκο υδατικού διαλύματος που περιέχει την κύρια ένωση και ο οποίος περιέχεται σε ένα φιαλίδιο. Το κλειστό φιαλίδιο το οποίο περιέχει τις δύο φάσεις και την ένωση που μελετάται, αναδεύεται με τη βοήθεια συσκευής vortex οδηγώντας στη διάσπαση της οργανικής σταγόνας σε μικροσταγόνες παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο

ταχύτερες κινητικές εκχύλισης της κύριας ένωσης. Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρείται για τον διαχωρισμό των δύο φάσεων και την επανάκτηση\επανασχηματισμό της οργανικής σταγόνας. Με τη βοήθεια μιας μικροσύριγγας η οργανική φάση απομακρύνεται από το υδατικό διάλυμα και εισάγεται σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης^[6].



Σχήμα 5. Σχηματική παράσταση της προτεινόμενης τεχνικής μικροεκχύλισης, VALLME πρίν την εισαγωγή της μικροσταγόνας, κατά την εισαγωγή και κατά την ανάκτηση της μικροσταγόνας αντίστοιχα με τη μικροσύριγγα μετά την ανάδευση/φυγοκέντρηση του δείγματος^[6]

6.2. Βελτιστοποίηση της μεθόδου. Παράμετροι που επηρεάζουν τη VALLME.

6.2.1. Επιλογή του οργανικού διαλύτη

Η επιλογή του οργανικού διαλύτη αποτελεί πολύ σημαντικό βήμα στην βελτιστοποίηση της μεθόδου της μικροεκχύλισης. Ο οργανικός διαλύτης-δέκτης της κύριας ένωσης που θα οδηγηθεί προς ανάλυση, πρέπει να είναι αδιάλυτος στο νερό ώστε να μη χάνεται μέσα στο υδατικό διάλυμα, να έχει χαμηλή πτητικότητα για τον περιορισμό της εξάτμισής του από το διάλυμα και να σχηματίζει μικροσταγόνα στην επιφάνεια του διαλύματος και όχι να απλώνεται στην επιφάνειά του. Επιπλέον ο οργανικός διαλύτης πρέπει να επιλέγεται βάση της μεγάλης διαλυτότητας της ένωσης σε αυτόν έναντι του υδάτινου διαλύματος^[6].

6.2.2. Επιλογή της μεθόδου ανάδευσης και της ταχύτητας

Η ανάδευση του διαλύματος χρησιμοποιείται για την επιτάχυνση της εκχύλισης της ένωσης από την υδατική φάση στην οργανική για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευσή της. Με την ανάδευση αυξάνει η επιφάνεια επαφής μεταξύ των μορίων της κύριας ουσίας και των μορίων της οργανικής φάσης. Με την αύξηση της ταχύτητας έχουμε γρηγορότερη κίνηση των μορίων των ενώσεων που μελετούνται και συνεπώς και γρηγορότερη και αποτελεσματικότερη μεταφορά τους στην οργανική φάση. Οι μέθοδοι ανάδευσης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι είτε με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα είτε με τη χρήση συσκευής vortex. Στην περίπτωση χρήσης του μαγνητικού αναδευτήρα πρέπει να ληφθεί υπόψη η περίπτωση αντίδρασης του διαλύματος με τον μαγνήτη (πλαστικός ή γυάλινος)^[6].

6.2.3. Επιλογή του όγκου της φάσης δότη και δέκτη

Η αναλογία όγκου δότη/δέκτη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου που ακολουθεί την εκχύλιση. Όσο μεγαλύτερος ο λόγος δότη/δέκτη πραγματοποιείται μεγαλύτερη προσυγκέντρωση των ουσιών που αναλύονται στην οργανική φάση. Ωστόσο, η αύξηση του λόγου 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^[3,6].

6.2.4. Επιλογή του χρόνου και της ταχύτητας εκχύλισης

Η μεταφορά της μάζας εξαρτάται από τον χρόνο και ο ρυθμός της ελαττώνεται κατά την επίτευξη της ισορροπίας. Επειδή συνήθως η εκχύλιση είναι μία χρονοβόρα διαδικασία, κατά την επιλογή του χρόνου εκχύλισης λαμβάνονται υπόψη η επίτευξη ικανοποιητικής προσυγκέντρωσης σε χρόνο ο οποίος να είναι ικανοποιητικός και μικρότερος από τον χρόνο που διαρκεί η αναλυτική τεχνική^[6].

6.2.5. Προσθήκη άλατος

Ανάλογα με τη φύση των ενώσεων που μελετώνται, μερικές φορές η προσθήκη άλατος μπορεί να μειώσει τη διαλυτότητά τους στο νερό βοηθώντας με αυτόν τον τρόπο την εκχύλιση. Η προσθήκη άλατος μπορεί να έχει θετική, αρνητική ή μηδενική επίδραση^[3,6].

6.2.6. Ρύθμιση pH

Η ρύθμιση του pH μπορεί να ενισχύσει την εκχύλιση καθώς επηρεάζεται η θέση ισορροπίας της διάστασης και η διαλυτότητα των όξινων/βασικών ενώσεων. Γι' αυτό το λόγο προσαρμόζεται κατάλληλα το pH των φάσεων δότη και δέκτη. Όταν εξετάζονται όξινες ενώσεις το pH της φάσης δότη προσαρμόζεται στην όξινη περιοχή για να αποφορτιστούν οι κύριες ενώσεις, να μειωθεί η διαλυτότητά τους στο διάλυμα και να εξασφαλιστεί η σίγουρη μεταφορά τους στην οργανική φάση^[3,6].

7. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Οι μέθοδοι μικροεκχύλισης ακολουθούνται-συνδυάζονται με μία μέθοδο διαχωρισμού του μίγματος που προκύπτει προκειμένου για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των κύριων ενώσεων. Η κύρια διαχωριστική μέθοδος που εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό των φουλλερενίων και συγκεκριμένα του C₆₀ για την περίπτωσή μας είναι αυτή της υγρής χρωματογραφίας φασματοσκοπίας μάζας, LC-MS^[6].

7.1. LC

Η Υγρή Χρωματογραφία αποτελεί μια από τις πλέον αξιόπιστες μεθόδους ενόργανης ανάλυσης, με ευρύτατη εφαρμογή στην επίλυση αναλυτικών και περιβαλλοντικών δειγμάτων. Στο σχήμα 5 δίνεται η διάταξη που χρησιμοποιείται στην LC-MS^[6].

Η διέλευση της κινητής φάσης από τη χρωματογραφική στήλη καλείται έκλουση. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται σαν εκλουστικά πρέπει να απαερώνονται για την αποφυγή φυσαλίδων και ασταθούς πιέσεως στο σύστημα ροής^[6].

Το τελευταίο τμήμα της διάταξης της LC είναι ο ανιχνευτής, ο οποίος μετρά μία χαρακτηριστική ιδιότητα του διαχωριζόμενου συστατικού, όπως π.χ. η απορρόφηση

 $\sim 25 \sim$

στο UV, ο φθορισμός, η ηλεκτρική αγωγιμότητα και ανάλογα με τη συγκέντρωσή του, δίνει το κατάλληλο σήμα. Στην περίπτωση του C_{60} η LC έχει συνδυαστεί με ανιχνευτή υπεριώδους (UV)^[3] και ανιχνευτή φασματοσκοπίας μάζας (MS)^[3].

Ο ανιχνευτής συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή για την ολοκλήρωση του χρωματογραφήματος και τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των συστατικών του μίγματος^[6].

Η ανάλυση της LC μπορεί να είναι κανονικής φάσεως ή αντίστροφης. Στην περίπτωση της αντίστροφης φάσης η κινητή φάση είναι πολικός διαλύτης όπως νερό, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, τολουόλιο ή μίγμα αυτών. Η στατική φάση είναι υδρογονάνθρακες με 18 ($C_{18}H_{38}$) ή 8 ($C_{8}H_{18}$) άτομα άνθρακα ή με διφαινύλια ή με ομάδες κυανίου κ.λ.π. που σχηματίζουν ένα υγρό υμένιο που προσροφάται ή δεσμεύεται χημικά στην επιφάνεια ενός στε

ρεού υποστρώματος, συνήθως silica gel.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ҮЛІКА

1.1. Αντιδραστήρια

Κατά τη διεργασία των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω χημικά για να προετοιμασία του προς ανάλυση δείγματος:

- 1. Φουλλερένια (C_{60}) του οίκου Aldrich
- Ακετονιτρίλιο του οίκου Merck με βαθμό καθαρότητας για υγρή χρωματογραφία LC-MS

- Τολουόλιο του οίκου Merck με βαθμό καθαρότητας για υγρή χρωματογραφία και LC-MS
- Αιθανόλη του οίκου Merck για την παρασκευή υδατικού διαλύματος από τολουολικό μέσω υπερήχων.

Τα πυκνά πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τολουολικά και υδατικά διαλύματα των 3024 ppm και 2,15 ppm αντίστοιχα. Τα πρότυπα εργασίας προετοιμάζονταν καθημερινά μέσω αραιώσεων από το stock του υδατικού που είχαμε προετοιμάσει πιο πριν ώστε να έχουν τα επιθυμητά επίπεδα συγκεντρώσεων. Για την προετοιμασία των υδατικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο (δις απιονισμένο) νερό από σύστημα καθαρισμού ύδατος EASYpureRF, του οποίου η προμήθεια έγινε από την Barnstead/Thermolyne.

1.2. Όργανα και Συσκευές

1. Γυάλινο φιαλίδιο των 22 mL με βιδωτό πώμα που φέρει black viton

septum επικαλυμμένο με Teflon

- 2. Hamilton HPLC μικροσύριγγα των 100 μL, μοντέλο 710 SNR
- 3. LC-MS system της HELLAMCO
- 4. Αναδευτήρας τύπου vortex (Reax Control, Heidolph, Germany)
- 5. Φυγόκεντρος (Labofuge 400 Heraeus, Kendro Laboratory Products,

Germany)

- 6. Συσκευή υπέρηχων, Bransonic[®] 2510 (Danbury, CT, USA)
- 7. Φασματοφωτόμετρο

1.3. Χαρακτηριστικά Υδατικών Δειγμάτων

1.3.1. Παρασκευή υδατικού μέσω ανάδευσης

Στη συγκεκριμένη περίπτωση το υδατικό, προετοιμάστηκε μέσω ανάδευσης στις 2500 rpm. Πιο συγκεκριμένα, διαλύθηκαν 0,997 g C₆₀ σε 1,246 L υπερκάθαρου νερού και το διάλυμα αφέθηκε να αναδεύεται για περίπου 27 μέρες με στον απαγωγό του εργαστηρίου τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο, προσπαθώντας να επιτευχθεί όσο το δυνατόν πιο σκοτεινό περιβάλλον. Το δείγμα φυλασσόταν σε σκοτεινό ντουλάπι και σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας των 27 ημερών, διαλύθηκε ορισμένη ποσότητα C₆₀ στο νερό με αποτέλεσμα το υδατικό να αποκτήσει σκούρο καφέ χρώμα. Στη συνέχεια, το δείγμα πέρασε από φίλτρο 0,47 μm^[7].

1.3.2. Παρασκευή υδατικού από τολουολικό μέσω υπερήχων

Στην περίπτωση αυτή, το υδατικό παρασκευάστηκε από stock τολουολικού μέσω υπερήχων. Πιο συγκεκριμένα, 10ml από το τολουολικό των 3024 ppm προστέθηκαν σε 200 ml υπερκάθαρου νερού σε ένα γυάλινο δοχείο πυρέξ, στο οποίο προστέθηκαν 6 ml αιθανόλης και το διάλυμα το τοποθετήθηκε στο σύστημα υπερήχων μέχρι να εξατμιστεί πλήρως το τολουόλιο (μωβ φάση) από την επιφάνεια του υδατικού. Εν συνεχεία, το διάλυμα που προέκυψε το πέρασε από φίλτρο διαμέτρου 0,2 μm (Ministar[®], Sartorius)^[3]. Το φιλτραρισμένο πλέον υδατικό που προέκυψε αναφέρεται πλέον ως το stock του υδατικού από το οποίο έγιναν οι διαδοχικές αραιώσεις για να προετοιμαστούν τα προς ανάλυση δείγματα ούτως ώστε να έχουν την επιθυμητή συγκέντρωση σε ppm που θα οδηγηθεί προς ανάλυση στο σύστημα LC-MS^[3].

1.3.3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του C₆₀ στο υδατικό διάλυμα

Στο stock του υδατικού που προέκυψε από τη μεταφορά του C₆₀ από το τολουόλιο στο νερό μέσω υπερήχων όπως αυτή περιγράφηκε στην παράγραφο 1.1.2. δεν είναι γνωστή η ποσότητα του C₆₀ που διαλύθηκε αφού δε διαλύεται όλο και ορισμένη ποσότητα κατακρατείται στο φίλτρο κατά τη διαδικασία του φιλτραρίσματος. Έτσι λοιπόν, έπρεπε πριν αναλυθεί το προς ανάλυση υδατικό δείγμα να γίνει γνωστή η συγκέντρωσή του για τις περαιτέρω αραιώσεις^[3].

Αρχικά, μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο η απορρόφηση τολουολικών διαλυμάτων του C₆₀ συγκεντρώσεων μεταξύ 1 και 5 ppm και σε πρόγραμμα excel υπολογίστηκε η εξίσωση της ευθείας.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του C₆₀ στο υδατικό ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Σε vial των 22 mL προστέθηκαν 5 mL από το υδατικό, 5 mL διάλυμα NaCl περιεκτικότητας 2% και 5 mL τολουόλιο και μετά από μαγνητική ανάδευση για 1 ώρα στις 2500 rpm το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία για 15 min περίπου για να διαχωριστούν οι φάσεις τολουόλιο – νερό. Με μια πιπέτα paster ανακτήθηκε η επιθυμητή ποσότητα από τη φάση του τολουολίου και μετρήθηκαν και με βάση την εξίσωση υπολογίστηκε η συγκέντρωση του υδατικού σε ppm. Η παραπάνω διαδικασία στηρίχθηκε στην υπόθεση ότι τα 5 ml τολουολίου επαρκούν για να προσροφήσουν όλη την ποσότητα του φουλλερενίου C_{60} στο υδατικό είναι ίση με:

$Y = 2,15 \, ppm$

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιούνταν καθημερινά για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του υδατικού και έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις σε 0,5 ppm του προς ανάλυση υδατικού.

1.4. Χαρακτηριστικά Τολουολικών Δειγμάτων

Τα προς ανάλυση τολουολικά δείγματα, παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο χρησιμοποιώντας υπέρηχους για τη διάλυση των C_{60} στο τολουόλιο. Πιο συγκεκριμένα, διαλύθηκαν 0,234 g C_{60} σε 80 mL τολουόλιο και αφέθηκαν στους υπέρηχους για περίπου μισή ώρα. Μετά την πάροδο της μισής ώρας, το C_{60} διαλύθηκε στο τολουόλιο, δίνοντάς του ένα σκούρο μωβ χρώμα. Το φιαλίδιο που περιείχε το stock, τυλίχθηκε με αλουμινόχαρτο και φυλάχθηκε στο ψυγείο^[3].

2. ME $\Theta O \Delta O \Sigma$ VALLME

Σύμφωνα με τη VALLME, 50 μL οκτανόλης προστέθηκαν σε 20 mL υδατικού δείγματος επιμολυσμένου με γνωστή συγκέντρωση C_{60} τα οποία είχαν τοποθετηθεί σε γυάλινα φιαλίδια φυγοκέντρου. Κατά την εισαγωγή της οκτανόλης στο υδατικό σχηματίστηκε μια μικροσταγόνα της οργανικής φάσης στην επιφάνεια της υδατικής. Εν συνεχεία, το μίγμα καλύφθηκε με καπάκι και septa καλυμμένο με αλουμινόχαρτο, αναδεύτηκε με τη χρήση vortex για 2 min στις 2500 rpm και φυγοκεντρήθηκε με σκοπό να διαχωριστούν οι δύο φάσεις. Μετά τη φυγοκέντρηση του δείγματος, ανακτήθηκαν 30 μL της οργανικής φάσης με τη βοήθεια μικροσύριγγας. Στη συνέχεια η ανακτημένη ποσότητα αναλύθηκε σε σύστημα LC-MS. Για να βελτιστοποιηθεί η μέθοδος και να αποφευχθούν τυχόν σφάλματα, όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν από δύο φορές^[6].

3. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΜΕ LC- MS

Για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση του C₆₀ στα υδατικά διαλύματα χρησιμοποιήθηκε σύστημα LC-MS (Agilent Technologies, 1200 series). Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν BETASIL C18 (100 mm x 2,1 mm x 5 μm, Thermo Scientific). Η κινητή φάση ήταν μίγμα σε αναλογία 60:40 Τολουόλιο:Ακετονιτρίλιο με ισοκρατική έκλουση και ροή 0,25 mL/min. Ο όγκος του προς ανάλυση δείγματος ήταν 20 μL και η ανίχνευση επιτεύχθηκε με ανιχνευτή φθορισμού με μήκος κύματος διέγερσης τα 328 nm^[8]. Η θερμοκρασία του φούρνου ήταν στους 25 °C και ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 10 min με το C₆₀ να εκλούεται περίπου στα 3,7 min.



Σχήμα 5. Σχηματική απεικόνιση του μηχανήματος LC-MS

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για το σκοπό των πειραμάτων της παρούσας εργασίας διάφοροι παράμετροι ελέγχθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν, όπως ο διαλύτης εκχύλισης, ο χρόνος και η ταχύτητα ανάδευσης, ο όγκος του διαλύτη και του διαλύματος, η προσθήκη άλατος και η επίδραση του pH του διαλύματος.

1. Επιλογή του οργανικού διαλύτη

Αρχικά, εξετάστηκαν δύο μη υδατοδιαλυτοί διαλύτες (ονομαστικά: 1-οκτανόλη και τολουόλιο) οι οποίοι διέφεραν ως προς την πολικότητά τους και τη διαλυτότητά τους στο νερό. Οι εξεταζόμενοι διαλύτες είχαν πυκνότητες μεγαλύτερες του νερού βοηθώντας με αυτόν τον τρόπο στη συλλογή της οργανικής φάσης και αποφεύγοντας την επιμόλυνση από το δείγμα κατά τη συλλογή της φάσης δέκτη. Κάθε φορά 50 μL οργανικού διαλύτη εισάγονταν σε 20 mL διαλύματος υπερκάθαρου επιμολυσμένου νερού με την προς ανάλυση ουσία συγκέντρωσης 0,5 ppm. Μετά την ανάδευση του μίγματος με τη βοήθεια vortex (2 min, 2500 rpm) το μίγμα φυγοκεντρήθηκε (2 min, 3500 rpm) διαχωρίζοντας εμφανώς τις δύο φάσεις. Στη συνέγεια, 30 μL από την οργανική φάση συλλέχθηκαν με τη βοήθεια μικροσύριγγας και χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση με LC-MS. Από τους δύο οργανικούς διαλύτες που εξετάστηκαν, παρατηρήθηκε ότι μόνο η 1-οκτανόλη είχε την ικανότητα να σχηματίσει μονή σταγόνα στην επιφάνεια του υδατικού διαλύματος καθώς το τολουόλιο διαγέεται στην επιφάνεια του υδατικού διαλύματος κάνοντας την συλλογή του αδύνατη. Συνεπώς, η 1-οκτανόλη επιλέχτηκε ως διαλύτης εκχύλισης για τις υπόλοιπες αναλύσεις.

2. Επιλογή του χρόνου ανάδευσης

Για την επιλογή του βέλτιστου χρόνου ανάδευσης στο vortex ανατρέξαμε στη βιβλιογραφία και επιλέχθηκε να είναι ο χρόνος των 2 min^[6]. Με βάση λοιπόν τη βιβλιογραφία, μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου ανάδευσης στην VALLME με τη χρήση του vortex. Χρόνοι ανάδευσης στο vortex που κυμαίνονταν από 0 έως 10 min εξετάστηκαν και η ισορροπία φαίνεται να αποκαταστάθηκε στα 2 min. Τα 2 min θεωρήθηκαν ο βέλτιστος χρόνος για το vortex στα οποία η εκχύλιση πραγματοποιείται υπό συνθήκες ισορροπίας και αυξημένης ακρίβειας και ευαισθησίας. Οπότε, και στη δική μας περίπτωση επιλέχθηκαν ως βέλτιστος χρόνος vortex τα 2 min.

3. Επιλογή της ταχύτητας ανάδευσης

Για την επιλογή της βέλτιστης ταχύτητας ανάδευσης στο vortex ανατρέξαμε στη βιβλιογραφία και επιλέχθηκε να είναι αυτή των 2500 rpm^[6]. Με βάση λοιπόν τη βιβλιογραφία, εξεταστηκε η επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης με το vortex από 0 έως 2500 rpm στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Παρατηρήθηκε ότι αυξάνοντας την ταχύτητα από 0 έως 1500 rpm παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση στην απόκριση του μηχανήματος. Περαιτέρω αύξηση δεν είχε σημαντική επίδραση στην εκχύλιση οπότε βασισμένοι πάνω σε αυτές τις παρατηρήσεις αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί η μέγιστη ταχύτητα του vortex (2500 rpm).

Έτσι λοιπόν και στη δική μας περίπτωση επιλέχθηκε ως βέλτιστη ταχύτητα vortex αυτή των 2500 rpm καθώς όσο αυξάνεται η ταχύτητα στο vortex, τόσο αυξάνεται και το μέγεθος της δίνης που προκαλείται από το στροβιλισμό του μίγματος των δύο φάσεων. Ο παράγοντας που επιδρά θετικά στην επίτευξη της δίνης είναι ο σχηματισμός μικρών σταγονιδίων μεγαλύτερης ειδικής επιφάνειας από την αρχική σταγόνα και σε αυτή την περίπτωση η μοριακή διάχυση θεωρείται κυρίαρχη^[6].

4. Επιλογή του όγκου του οργανικού διαλύτη

Στο συγκεκριμένο σημείο εξετάστηκε η επίδραση του όγκου της φάσης δέκτη στη VALLME (διάγραμμα 1). Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων στην προκείμενη φάση, όγκοι 1-οκτανόλης που κυμαίνονταν από 50-80 μL τοποθετήθηκαν μέσω μικροσύριγγας σε 20 mL υδατικού διαλύματος που περιείχε το C_{60} συγκέντρωσης 0,5 ppm. Στη συνέχεια το μίγμα αναδεύτηκε με τη βοήθεια μηχανήματος vortex (2 min, 2500 rpm) και φυγοκεντρήθηκε (2 min, 3500 rpm). Μετά τη φυγοκέντρηση η σταγόνα της 1-οκτανόλης είχε επανασχηματιστεί και 30 μL από την οκτανολική φάση συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση στο μηχάνημα LC-MS. Ο λόγος που επιλέχθηκαν τα 50μL οκτανόλης είναι επειδή σε μικρότερους όγκους θα ήταν δύσκολο να ανακτηθούν τα 30 μL εξαιτίας της μερικής διάλυσης της οκτανόλης στην υδατική φάση. Τα αποτελέσματα του διαγράμματος 1, φανερώνουν ότι με την αύξηση του όγκου της μικροσταγόνας περιορίζεται η έκταση της εκχύλισης για το C_{60} . Πράγματι, με την αύξηση του όγκου της φάσης δέκτη αναμένεται μείωση των συγκεντρώσεων των κύριων ενώσεων στην οκτανολική φάση^[6]. Επομένως, τα 50 μL ήταν ο βέλτιστος όγκος του οργανικού διαλύτη.





VALLME

5. Επιλογή του όγκου του υδατικού διαλύματος

Στο συγκεκριμένο σημείο μελετήθηκε η επίδραση του όγκου του υδατικού διαλύματος στην VALLME. Για το σκοπό αυτό, όγκοι υδατικού διαλύματος οι οποίοι κυμαίνονταν από 5 έως 20 mL συγκέντρωσης 0,5 ppm, εκχυλίστηκαν από 50 μL 1οκτανόλης με ανάδευση του μίγματος με τη βοήθεια vortex (2 min, 2500 rpm) και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν (2 min, 3500 rpm). Όπως αποδείχθηκε από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν (διάγραμμα 2), αυξάνοντας τον όγκο του επιμολυσμένου υδατικού διαλύματος αυξάνεται εμφανώς η συνολική ποσότητα του C_{60} που εκχυλίστηκε αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο και την προσυγκέντρωση της ουσίας στη σταγόνα^[6]. Έτσι λοιπόν, για τη διεξαγωγή των υπόλοιπων πειραματικών μετρήσεων, επιλέχθηκε ο όγκος των 20 mL υδατικού διαλύματος.



Διάγραμμα 2: Η επίδραση του όγκου του υδατικού διαλύματος στην VALLME

6. Επίδραση του pH

Στη συγκεκριμένη ενότητα εξετάστηκε η επίδραση του pH στην αποτελεσματικότητα της VALLME. Σε δουλειά που εξέδωσαν οι Hsin-Chang Chen et al ^[3], παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση της τιμής του pH αυξανόταν η απόκριση του μηχανήματος για το C_{60} . Κατά τη διάρκεια λοιπόν των πειραμάτων που διεξήχθησαν στο εργαστήριο για τιμές του pH που κυμάνθηκαν από 2 έως 10, δεν παρατηρήθηκε σημαντική αρνητική επίδραση στην εκχύλιση της κύριας ένωσης (διάγραμμα 3). Παρατηρήθηκε επίσης αύξηση της απόκρισης του μηχανήματος όσο αύξανε το pH του υδατικού, χωρίς ωστόσο να είναι σημαντική η αύξηση αυτή. Επομένως, αποφασίστηκε να μην γίνει αλλαγή στο pH του υδατικού δείγματος.



Διάγραμμα 3: Η επίδραση της αλλαγής του pH στην VALLME

7. Προσθήκη άλατος

Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η ελάττωση της υδατοδιαλυτότητας των οργανικών ενώσεων, λόγω της παρουσίας διαλυμένου NaCl, αναμένεται να επηρεάσει θετικά την εκχύλιση των ενώσεων αυτών^[6]. Έτσι λοιπόν, μελετάται η

επίδραση της προσθήκης άλατος και στην παρούσα εργασία σε μια σειρά πειραμάτων που διεξήχθησαν στο εργαστήριο. Πιο συγκεκριμένα, σε 20 mL υδατικού συγκέντρωσης 0,5 ppm σε C₆₀ και συγκεντρώσεων 0 έως 2% σε NaCl προστέθηκαν 50 μL 1-οκτανόλης. Στη συνέχεια, το μίγμα αναδεύτηκε με τη βοήθεια vortex (2min στις 2500 rpm) και φυγοκεντρήθηκε (2min στις 3500 rpm). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εξής πειραματική διαδικασία παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα (διάγραμμα 4). Από το παρακάτω διάγραμμα γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι η παραμικρή προσθήκη άλατος επιδρά θετικά στην εκχύλιση του C₆₀. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι όσο αυξάνει η προσθήκη άλατος σε ποσοστό 1% αυξάνεται και η απόκριση του μηχανήματος ενώ σε ποσοστό 2% το σήμα μειώνεται. Οπότε, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι μικρή ποσότητα άλατος αυξάνει δραματικά την απόκριση του σήματος με βέλτιστη ποσότητα εκείνη σε ποσοστό 1%. Λόγω λοιπόν των παραπάνω παρατηρήσεων, αποφασίστηκε να γίνεται προσθήκη άλατος σε ποσοστό 1% που αντιστοιχούν σε 0,2 g NaCl σε 20 mL υδατικού δείγματος.



Διάγραμμα 4: Η επίδραση της προσθήκης άλατος στην VALLME

8. Χρήση βέλτιστων συνθηκών

Στο παρακάτω διάγραμμα (διάγραμμα 5) παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του C_{60} . Το C_{60} εκλούεται από το μηχάνημα LC-MS περίπου στα 3,7 min. Οι δύο κορυφές που προηγούνται χρονικά του φουλλερενίου είναι το τολουόλιο και η 1-οκτανόλη αντίστοιχα. Το χρωματογράφημα που απεικονίζεται παρακάτω αντιπροσωπεύει τις βέλτιστες συνθήκες κατά τις οποίες: 50 μL 1-οκτανόλης εισήχθησαν σε 20 mL υδατικού διαλύματος συγκέντρωσης 0,5 ppm σε C_{60} και 1% NaCl. Στη συνέχεια το μίγμα αναδεύτηκε με τη βοήθεια vortex (2 min, 2500 rpm) και φυγοκεντρήθηκε (2 min, 3500 rpm) για να διαχωριστούν οι δύο φάσεις. Έπειτα από το διαχωρισμό των δύο φάσεων, από τη σταγόνα που είχε σχηματισθεί, ανακτήθηκαν 30 μL και χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση στης LC-MS.



Διάγραμμα 5: χρωματογράφημα στην LC-MS του τολουολίου (1), 1-οκτανόλης (2) και του φουλλερενίου C₆₀ (3)

9. Περαιτέρω μελλοντικοί ερευνητικοί στόχοι

Στη συγκεκριμένη πειραματική εργασία, επιτεύχθηκε η απομόνωση και η ανίχνευση του φουλλερενίου C_{60} , πραγματοποιήθηκε μικροεκχύλιση με χρήση της τεχνικής VALLME. Επίσης μελετήθηκαν η επίδραση της αλατότητας και της αλλαγής του pH του υδατικού στη μέθοδο της μικροεκχύλισης. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για την επιλογή του κατάλληλου όγκου του υδατικού και της οργανικής ουσίας (1-οκτανόλης). Αντικείμενο για περαιτέρω μελλοντική έρευνα αποτελεί η επιβεβαίωση των τιμών που πήραμε από τη βιβλιογραφία για τη βέλτιστη ταχύτητα vortex εκείνη των 2500rpm και βέλτιστο χρόνο, το χρόνο των 2 min^[6] καθώς και να γίνει αξιολόγηση της γραμμικότητας της μεθόδου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Η προτεινόμενη μέθοδος μικροεκχύλισης, VALLME, συντελεί στην ανάπτυξη μεθόδων άμεσης προετοιμασίας του προς ανάλυση δείγματος οι οποίες θα είναι σχετικά απλές στην εφαρμογή τους, οικονομικές μιας και οι όγκοι υδατικού και οργανικού διαλύτη, 20 mL και 50 μL αντίστοιχα, είναι πολύ μικροί σε σχέση με άλλες μεθόδους εκχύλισης. Επίσης, στη συγκεκριμένη μέθοδο, ο συνολικός χρόνος προετοιμασίας του προς ανάλυση δείγματος ήταν πολύ μικρός το οποίο μας έδινε τη δυνατότητα να πραγματοποιούμε αυξημένο αριθμό επαναλήψεων εντός μιας ημέρας και με μεγάλη ευαισθησία και ακρίβεια.

Στη συγκεκριμένη μέθοδο, σε σύγκριση με άλλες μεθόδους μικροεκχύλισης, παρατηρήσαμε ότι η ισορροπία αποκαθίσταται σε μικρότερο χρονικό διάστημα συντελώντας έτσι στην αποφυγή σφαλμάτων κατά τη διαδικασία της ανάλυσης. Η VALLME, είναι μια οικονομική και πολλά υποσχόμενη μέθοδος παρασκευής δείγματος και δύναται να χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση ιχνοποσοτήτων οργανικών ρυπαντών σε περιβαλλοντικά δείγματα. Επίσης, αυτό που πρέπει να αναφερθεί είναι ότι η μέθοδος VALLME εφαρμόζεται για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση υδατικών διαλυμάτων του C₆₀. Το ότι η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται σε υδατικά διαλύματα φουλλερενίου μας δίνει το υπόβαθρο για περαιτέρω ανάπτυξή της όπως είναι ο έλεγχος της γραμμικότητάς. Άξιο αναφοράς είναι επίσης το γεγονός ότι για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση του C₆₀ στα υδατικά του διαλύματα είναι η πρώτη φορά που εφαρμόζεται η μέθοδος VALLME καθώς άλλες μέθοδοι κάνουν προσυγκέντρωση του C₆₀ που είναι διαλυμένο στο νερό σε 4 mL τολουολίου και εν συνεχεία διαδοχικές αραιώσεις^[3] ενώ στη μέθοδο VALLME πραγματοποιήθηκε προσυγκέντρωση του υπό εξέταση φουλλερενίου σε 50 μL 1-οκτανόλης.

- (1) <u>http://library.certh.gr/libfiles/PDF/EL-PAPYR-3664-NANOYLIKA-by-</u> <u>MPAMPABEA-in-FARMAKEVTIKH-VOL-21-ISS-1-PP-10-21-Y-2008.pdf</u>=o
- (2) <u>http://invenio.lib.auth.gr/record/114034/files/louizos.pdf?version=1</u>
- (3) Hsin-Chang Chen et al, Determination of aqueous fullerene aggregates in water by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry, Department of chemistry, Taiwan
- (4) Stephen J. Klaine et al. 2008, Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, Bioavailability and effects, Institute of environmental technology, Australia
- (5) Carl W. Isaacson et. al. 2009, Quantitative of fullerene Nanomaterials in Environmental Systems: A Critical Review, Department of chemistry, Oregon.
- (6) Ευαγγελία Γιαντζή και λοιποί 2007, Προσδιορισμός δισφαινόλης Α, οκτυλφαινόλης και νονυλφαινόλης σε υδατικά διαλύματα με χρήση της τεχνικής μικροεκχύλισης με ελεύθερη σταγόνα, εργαστήριο χημείας, Πολυτεχνείου Κρήτης, Χανιά.
- Jonathan A. Brant et. al. 2006, Characterizing the Impact of Preparation Method on Fullerene Cluster Structure and Chemistry, Department of Civil and Environmental Engineering, France.
- (8) Shigeru Deguchi et. al. 2001, Stable Dispersions of fullerenes, C₆₀ and C₇₀ in water. Preparation and Characterization, Japan Marine Science and Technology Center, Japan
- D. Heymann 2006, Solubility of fullerenes C₆₀ and C₇₀ in Seven Normal Alcohols and Their Deduced Solubility in Water, Department of Geology and Geophysics, USA.
- (10) Stolpe B, Hassello" v M. 2007. Changes in size distribution of fresh water nanoscale colloidal matter and associated elements on mixing with seawater. Geochim Cosmochim Acta 71:3292–3301.

- (11) Middelburg JJ, Hennan PMJ. 2007. Organic matter processing in tidal estuaries. Mar Chem 106:127–147.
- (12) Hirose K. 2007. Metal-organic matter interaction: Ecological roles of ligands in oceanic DOM. Appl Geochem 22:1636–1645.
- (13) Yamashita Y, Tsukasaki A, Nishida T, Tanoue E. 2007. Vertical and horizontal distribution of fluorescent dissolved organic mat-ter in the Southern Ocean. Mar Chem 106:498–509.
- (14) Wurl O, Obbard JP. 2004. A review of pollutants in the sea-surface microlayer (SML): A unique habitat for marine organ-isms. Mar Pollut Bull 48:1016–1030.
- (15) Simpkiss K. 1990. Surface effects in ecotoxicology. Funct Ecol 4:303– 308.
- (16) Fernandes TF, Christofi N, Stone V. 2007. The environmental implications of nanomaterials. In Monteiro-Riviere N, Lang Tran C, eds.
 Nanotoxicology: Characterization, Dosing and Health Effects. CRC, Boca Raton, FL, USA, pp 405–420.
- (17) Baun A, Sorensen SN, Rasmussen RF, Hartmann NB, Koch CB. 2008. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic com-pounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C60. Aquat Toxicol 86:379–387.
- (18) Roberts AP, Mount AS, Seda B, Souther J, Qiao R, Lin S, Ke PC, Rao AM, Klaine SJ. 2007. In vivo biomodification of lipid-coated carbon nanotubes by Daphnia magna. Environ Sci Tech-nol 41:3025–3029.
- (19) Kim JS, Yoon T-J, Yu KN, Kim BG, Park SJ, Kim HW, Lee KH, Park SB, Lee J-K, Cho MH. 2006. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. Toxicol Sci 89: 338–347.
- (20) Gao XH, Chan WCW, Nie SM. 2002. Quantum-dot nanocrystals for ultrasensitive biological labeling and multicolor optical en-coding. Journal of Biomedical Optics 7:532–537.
- Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, Mattoussi H. 2005. Quan-tum dot bioconjugates for imaging, labeling and sensing. Nature Materials 4:435–446.

- (22) Diao JJ, Hua D, Lin J, Teng HH, Chen D. 2005. Nanoparticle delivery by controlled bacteria. Journal of Nanoscience and Nanotechnology 5:1749– 1751.
- (23) Pickering KD, Wiesner MR. 2005. Fullerol-sensitized produc-tion of reactive oxygen species in aqueous solution. Environ Sci Technol 39:1359–1365.
- (24) Kai Y, Komazawa Y, Miyajima A, Miyata N, Yamakoshi Y. 2003.
 Fullerene as a novel photoinduced antibiotic. Fullerines, Nanotubes and Carbon Nanostructures 11:79–87.
- (25) Lyon DY, Fortner JD, Sayes CM, Colvin VL, Hughes JB. 2005. Bacterial cell association and antimicrobial activity of a C-60 water suspension. Environ Toxicol Chem 24:2757–2762.
- (26) Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, Yacaman MJ. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 16:2346–2353.
- (27) Sondi I, Salopek-Sondi B. 2004. Silver nanoparticles as anti-microbial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. J Colloid Interface Sci 275:177–182.
- (28) Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, Noireaux V, Brivanlou AH, Libchaber A. 2002. In vivo imaging of quantum dots encap-sulated in phospholipid micelles. Science 298:1759–1762.
- (29) Kloepfer JA, Mielke RE, Nadeau JL. 2005. Uptake of CdSe and CdSe/ZnS quantum dots into bacteria via purine-dependent mechanisms. Appl Environ Microbiol 71:2548–2557.
- (30) Xu XH, Brownlow WJ, Kyriacou SV, Wan Q, Viola JJ. 2004. Real-time probing of membrane transport in living microbial cells using single nanoparticle optics and living cell imaging. Biochemistry 43:10400– 10413.
- (31) Jang H, Pell LE, Korgel BA, English DS. 2003. Photolumines-cence quenching of silicon nanoparticles in phospholipid vesicle bilayers. J Photochem Photobiol A Chem 158:111–117.
- (32) Tsao N, Kanakamma PP, Luh TY, Chou CK, Lei HY. 1999. Inhibition of Escherichia coli-induced meningitis by carboxy-fullerence. Antimicrob Agents Chemother 43:2273–2277.

- (33) Hwang ET, Lee JH, Chae YJ, Kim BC, Sang B-I, Gu MB. 2007. Analysis of nanoparticles' toxic modes of actions by using re-combinant bioluminescent bacteria. Abstracts, American Insti-tute of Chemical Engineers Meeting, Salt Lake City, UT, USA, November 4–9, 60e.
- (34) Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. Int Microb 3: 3–8.
- (35) Dyadyusha L, Yin H, Jaiswal S, Brown T, Baumberg JJ, Booy FP, Melvin T. 2005. Quenching of CdSe quantum dot emission, a new approach for biosensing. Chem Commun 25:3201–3203.
- (36) Sapsford KE, Pons T, Medintz IL, Mattoussi H. 2006. Biosensing with luminescent semiconductor quantum dots. Sensors 6:925–953.
- (37) Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, Noireaux V, Brivanlou AH, Libchaber A. 2002. In vivo imaging of quantum dots encap-sulated in phospholipid micelles. Science 298:1759–1762.
- (38) Xiang JJ, Tang JQ, Zhu SG, Nie XM, Lu HB, Shen SR, Li XL, Tang K, Zhou M, Li GY. 2003. IONP-PLL: A novel non-viral vector for efficient gene delivery. Journal of General Medicine 5:803–817.
- (39) Takenaka S, Yamashita K, Takagi M, Hatta T, Tanaka A, Tsuge O. 1999. Study of the DNA interaction with water-soluble cat-ionic fullerene derivatives. Chemistry Letters 28:319–320.
- (40) Zhao X, Striolo A, Cummings PT. 2005. C60 binds to and deforms nucleotides. Biophys J 89:3856–3862.
- (41) Takenaka S, Yamashita K, Takagi M, Hatta T, Tsuge O. 1999. Photoinduced DNA cleavage by water-soluble cationic fuller-ene derivatives. Chemistry Letters 4:321–322.
- (42) Lyon DY, Brunet L, Hinkal GW, Wiesner MR, Alvarez PJJ. 2008.
 Antibacterial activity of fullerene water suspensions (nC60) is not due to ROS-mediated damage. Nano Letters 8:1539–1543.
- (43) Worle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF. 2006. Oops they did it again!
 Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. Nano Letters 6:1261– 1268.

- Mashino T, Okuda K, Hirota T, Hirobe M, Nagano T, Mochizuki M. 1999.
 Inhibition of E. coli growth by fullerene derivatives and inhibition mechanism. Bioorg Med Chem Lett 9:2959–2962.
- (45) Mashino T, Nishikawa D, Takahashi K, Usui N, Yamori T, Seki M, Endo T, Mochizuki M. 2003. Antibacterial and antiprolif-erative activity of cationic fullerene derivatives. Bioorg Med Chem Lett 13:4395–4397.
- (46) Thill A, Spalla O, Chauvat F, Rose J, Auffan M, Flank AM. 2006.
 Cytotoxicity of CeO2 nanoparticles for Escherichia coli: A physicochemical insight of the cytotoxicity mechanism. En-viron Sci Technol 40:6151–6156.
- (47) Dabbousi BO, RodriguezViejo J, Mikulec FV, Heine JR, Mat-toussi H, Ober R, Jensen KF, Bawendi MG. 1997. (CdSe) ZnS core-shell quantum dots: Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. J Phys Chem B 101:9463–9475.
- Kim S, Fisher B, Eisler HJ, Bawendi M. 2003. Type-II quantum dots: CdTe/CdSe (core/shell) and CdSe/ZnTe (core/shell) het-erostructures. J Am Chem Soc 125:11466–11467.
- (49) Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Suga M, Sasaki YF, Ohta T, Yasuhara M, Suzuki K, Yamamoto K. 2004. Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots de-pend on their surface modification. Nano Letters 4:2163–2169.
- (50) Matsumura Y, Yoshikata K, Kunisaki S, Tsuchido T. 2003. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. Appl Environ Microbiol 69:4278–4281.
- (51) Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. J Biomed Mater Res 52:662–668.
- (52) Yang L, Watts DJ. 2005. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. Toxicol Lett 158:122–132.
- (53) Brunauer S, Emmett PH, Teller E. 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. J Am Chem Soc60:309–319.