



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

**Προσδιορισμός δισφαινόλης Α, οκτυλφαινόλης και
νονυλφαινόλης σε υδατικά διαλύματα με χρήση της
τεχνικής μικροεκχύλισης με ελεύθερη σταγόνα**

ΓΙΑΝΤΖΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

Εξεταστική Επιτροπή:

Ελευθερία Ψυλλάκη (επιβλέπουσα)

Καλογεράκης Νικόλαος

Διαμαντόπουλος Ευάγγελος

ΧΑΝΙΑ 2007

Περιεχόμενα

| | |
|---|----|
| Περιεχόμενα..... | 2 |
| Θεωρητικό μέρος | 3 |
| 1. Εισαγωγή | 3 |
| 1.1. Ενδοκρινικοί διαταράκτες..... | 3 |
| 1.2. Νουυλφαινόλη – Οκτυλφαινόλη – Δισφαινόλη-A | 6 |
| 2. Τοξικότητα..... | 12 |
| 3. Τύχη στο υδατικό περιβάλλον | 14 |
| 4. Ισχύουσα νομοθεσία | 15 |
| 5. Μικροεκχύλιση | 16 |
| 5.1. Προτεινόμενη μέθοδος μικροεκχύλισης: Καινοτόμος μέθοδος μικροεκχύλισης με ελεύθερη σταγόνα (Free Drop Microextraction, FDME)..... | 19 |
| 6. Χρωματογραφία..... | 22 |
| 6.1. HPLC | 23 |
| Πειραματικό μέρος | 25 |
| 1. Υλικά | 25 |
| 1.1. Αντιδραστήρια | 25 |
| 1.2. Όργανα – Συσκευές | 25 |
| 1.3. Χαρακτηριστικά υδατικών περιβαλλοντικών δειγμάτων | 25 |
| 2. Μέθοδος FDME | 26 |
| 3. Αναλύσεις με HPLC | 26 |
| Πειραματικά αποτελέσματα και συζήτηση..... | 27 |
| 1. Επιλογή του οργανικού διαλύτη | 27 |
| 2. Επιλογή του χρόνου ανάδευσης..... | 27 |
| 3. Επιλογή της ταχύτητας ανάδευσης..... | 29 |
| 4. Επιλογή του όγκου του οργανικού διαλύτη..... | 30 |
| 5. Επιλογή του όγκου του υδατικού διαλύματος | 31 |
| 6. Επίδραση του pH | 32 |
| 7. Προσθήκη άλατος..... | 33 |
| 8. Χρήση των βέλτιστων συνθηκών | 34 |
| 9. Εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών σε πραγματικά δείγματα..... | 36 |
| Συμπεράσματα | 39 |
| Βιβλιογραφία | 40 |

1. Εισαγωγή

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο προσδιορισμός ορισμένων φαινολών, οι οποίες απαντώνται σε υδατικά περιβάλλοντα και εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα. Ως τέτοια περιβάλλοντα μπορούν να αναφερθούν το νερό των ποταμών και το νερό που καταναλώνεται για οικιακή χρήση. Πιο συγκεκριμένα, μελετώνται οι νουλφαινόλη, οκτυλφαινόλη και δισφαινόλη Α. Η δράση των ουσιών αυτών ενδέχεται να υπέχει αρνητικές συνέπειες στην υγεία διαφόρων έμβιων οργανισμών. Αυτό συμβαίνει για το λόγο ότι οι εν λόγω φαινόλες αποτελούν ενδοκρινικούς διαταράκτες που επηρεάζουν δυσμενώς το ενδοκρινικό σύστημα. Για παράδειγμα, στα πλαίσια αυτής της δράσης έχουν αναφερθεί διαταραχές στη λειτουργία του θυρεοειδούς.

Τα παραπάνω στοιχεία αναδεικνύουν τη σημασία μιας αποτελεσματικής μεθόδου προσδιορισμού των ουσιών αυτών. Υπό το πρίσμα αυτό προτείνεται μια νέα μέθοδος προσδιορισμού των αναφερθέντων φαινολών. Η πρωτοτυπία της προτεινόμενης μεθόδου έγκειται κυρίως στην ελαχιστοποίηση του χρόνου προετοιμασίας του δείγματος καθώς και στην απλότητα της ακολουθούμενης πειραματικής διαδικασίας, χωρίς απώλειες στην αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

1.1. Ενδοκρινικοί διαταράκτες

Ως ενδοκρινικοί διαταράκτες (**endocrine disrupters, EDS**) ονομάζονται οι εξωγενείς ενώσεις οι οποίες αλλάζουν τη/τις λειτουργία/ες του ενδοκρινικού συστήματος και συνεπώς προκαλούν μη επιθυμητές επιπτώσεις σε ολόκληρους οργανισμούς ή τους απογόνους τους ή τους (υπο)πληθυσμούς^[1].

Μηχανισμοί διατάραξης^[1]

Μερικές χημικές ουσίες μπορούν να δράσουν στο ενδοκρινικό σύστημα και να παρενοχλήσουν τους ομοστατικούς μηχανισμούς του οργανισμού ή να εκκινήσουν διαδικασίες σε μη φυσιολογικούς χρόνους του κύκλου ζωής (εικόνα 1). Ανάλογα με τη δραστηριότητά τους μπορούν να χαρακτηρισθούν ως διαμορφωτές οιστρογόνων ή

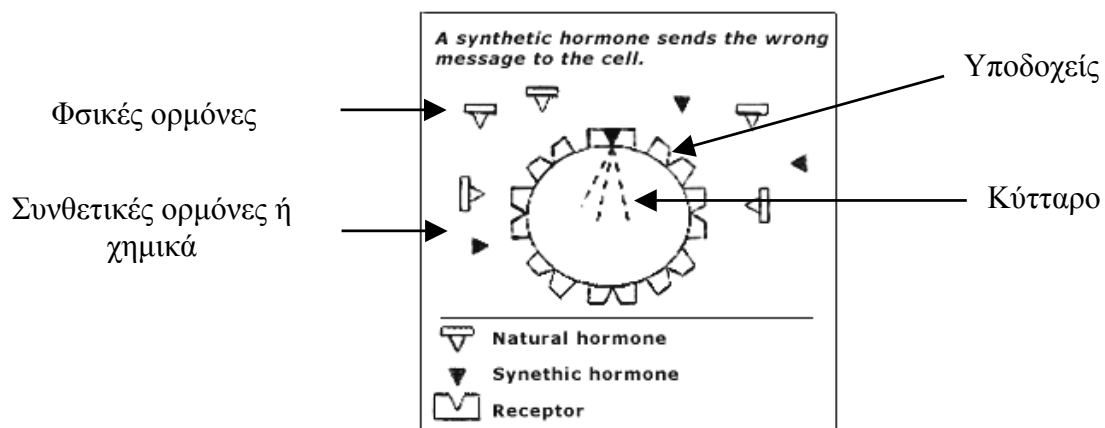
διαμορφωτές ανδρογόνων ¹²¹. Οι χημικές ουσίες μπορούν να ασκήσουν την επίδρασή τους μέσω διάφορων μηχανισμών:

- Μπορεί να μιμηθούν τη βιολογική δραστηριότητα μιας ορμόνης (π.χ. των ορμονών που καθορίζουν το φύλο, τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα) ¹²¹ και να συνδεθούν με τον κυτταρικό δέκτη, προκαλώντας άγνωστη απόκριση εκκινώντας την φυσιολογική απόκριση του κυττάρου στην φυσική ορμόνη στον λάθος χρόνο ή σε εκτεταμένη διάρκεια (συναγωνιστική δράση).
- Μπορεί να ενωθούν με τον δέκτη αλλά χωρίς να τον ενεργοποιήσουν. Εναντίως, η παρουσία της χημικής ουσίας στον δέκτη παρεμποδίζει την φυσική ορμόνη (π.χ. αντι-οιστρογόνα ή αντι-ανδρογόνα) (ανταγωνιστική δράση).
- Μπορεί να ενωθεί με τις πρωτεΐνες μεταφορείς του αίματος, αλλοιώνοντας με αυτόν τον τρόπο τον αριθμό των φυσικών ορμονών που είναι παρούσες στην κυκλοφορία.
- Μπορεί να παρεμβληθούν στις μεταβολικές διαδικασίες του σώματος, επηρεάζοντας το ρυθμό σύνθεσης ή διάσπασης των φυσικών ορμονών.

Μέχρι σήμερα, εξαιτίας μιας σειράς παρατηρήσεων σε ανθρώπους και φύση το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στην διαταραχή των συγκεκριμένων ορμονών οι οποίες έχουν καθοριστικό ρόλο στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη. Ο κύριος τομέας ανησυχίας είναι οι στεροϊδείς ορμόνες που παράγονται από τα γονίδια τα οποία, σε σύμπραξη με άλλες ορμόνες (κυρίως αυτές που παράγονται από το βλεννογόνο), ρυθμίζουν διαδικασίες όπως η αναπαραγωγή και η σεξουαλική συμπεριφορά, η εμβρυϊκή διαφοροποίηση και ανάπτυξη, και η ωρίμανση. Επηρεάζουν επίσης το ανοσοποιητικό σύστημα και γενικά το μεταβολισμό.

Πιο πρόσφατα, έρευνες έχουν δείξει ότι ορισμένες χημικές ουσίες μπορεί να διαταράζουν τη λειτουργία του θυρεοειδή, με την ανησυχία να επικεντρώνεται ιδιαίτερα στο ρόλο του θυρεοειδή στη διαδικασία της ανάπτυξης.

Υπάρχουν αποδείξεις ότι ορισμένοι γνωστοί ενδοκρινικοί διαταράκτες μπορεί να έχουν και μερική νευροτοξικότητα αν και δεν είναι γνωστοί οι μηχανισμοί μέσω των οποίων αυτό συμβαίνει.



Εικόνα 1: Μηχανισμός διατάραξης των κυττάρων από τις συνθετικές ορμόνες ή τα χημικά.

Τι γνωρίζουμε για τους ενδοκρινικούς διαταράκτες ^[1]

Η κύρια απόδειξη ότι η έκθεση σε περιβαλλοντικά χημικές ουσίες μπορεί να προκαλέσει διαταραχή των ενδοκρινικών λειτουργιών προέρχεται από αλλαγές που έχουν παρατηρηθεί σε διάφορα είδη της φύσης. Οι επιδράσεις που σχετίζονται με ενδοκρινικές διαταραχές έχουν παρατηρηθεί σε μαλάκια, καρκινοειδή, ψάρια, ερπετά, πτηνά και θηλαστικά διαφόρων περιοχών του πλανήτη.

Χημικές ουσίες με ορμονική δραστηριότητα – πιθανοί ενδοκρινικοί διαταράκτες – περιλαμβάνουν:

- **Φυσικές ορμόνες** από οποιοδήποτε ζώο, απελευθερωμένες στο περιβάλλον, και χημικές ουσίες οι οποίες παράγονται από ένα είδος και προκαλούν ορμονικές δράσεις σε άλλα ζώα, π.χ. ανθρώπινες ορμόνες οι οποίες επανενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της διάθεσης των ανθρώπινων λυμάτων από τις εκροές των βιολογικών καθαρισμών και οι οποίες προκαλούν αλλαγές στα ψάρια.
- **Φυσικές χημικές ουσίες** που περιλαμβάνουν τοξίνες οι οποίες παράγονται από συστατικά των φυτών (γνωστά ως φυτοοιστρογόνα, όπως η γενιστεΐνη ή η κουμεστρόλη) και ορισμένοι μύκητες.
- **Φαρμακευτικές ουσίες** που αναμένεται να έχουν υψηλή ορμονική δράση, π.χ. το αντισυλληπτικό χάπι και ορμονικές θεραπείες για τον καρκίνο μπορούν επίσης να ανιχνευθούν σε εκροές βιολογικών καθαρισμών.
- **Χημικές ουσίες κατασκευασμένες από τον άνθρωπο** και τα παραπροϊόντα τους μπορούν να απελευθερωθούν στο περιβάλλον. Εργαστηριακές δοκιμές έχουν

δείξει ότι τέτοιες χημικές ουσίες μπορούν να προκαλέσουν ενδοκρινικές αλλαγές. Αυτές περιλαμβάνουν ορισμένα φυτοφάρμακα (π.χ. DDT και άλλες χλωριωμένες ενώσεις), χημικά σε μερικά καταναλωτικά και ιατρικά προϊόντα (π.χ. ορισμένα πλαστικά πρόσθετα) και ένα αριθμό βιομηχανικών χημικών (π.χ. πολυχλωριωμένα διφαινόλια (PCBs), διοξίνες). Η ορμονική δραστηριότητα αυτών των χημικών είναι πολλές φορές ασθενέστερη από αυτή των φυσικών ορμονών, όπως της νονυλφαινόλης (προϊόν διάσπασης των επιφανειοδραστικών αιθοξυλιωμένων αλκυλφαινολών) η οποία έχει αποτελεί ρυπαντή χαμηλού επιπέδου σε ορισμένα ποτάμια στην Ευρώπη και έχει οιστρογονική δράση περί το ένα εκατοστό της φυσικής ορμόνης, του οιστρογόνου.

Που επιδρούν οι EDS^[3]

Στη φύση, οι EDS φαίνεται να προκαλούν ανωμαλίες και να εξασθενούν την αναπαραγωγική διαδικασία σε ορισμένα είδη και να σχετίζονται με αλλαγές στο ανοσοποιητικό, την συμπεριφορά και σκελετικές δυσμορφίες.

Στον άνθρωπο οι EDS παρουσιάζεται να ευθύνονται για προφανείς αλλαγές στην ανθρώπινη υγεία κατά τις τελευταίες δεκαετίες. Αυτές περιλαμβάνουν μείωση στην ποσότητα του σπέρματος σε ορισμένες γεωγραφικές περιοχές, αυξημένα περιστατικά αγοριών που γεννιούνται με γεννητικές δυσμορφίες και αύξηση των περιστατικών ορισμένων καρκίνων που σχετίζονται με τις ορμόνες. Επιπλέον σχετίζονται με την εξασθένηση στην ανάπτυξη των νευρώνων και της σεξουαλικής συμπεριφοράς.

1.2. Νονυλφαινόλη – Οκτυλφαινόλη – Δισφαινόλη-A

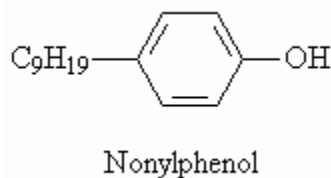
Η παρούσα διατριβή μελετά τον προσδιορισμό της Νονυλφαινόλης, Οκτυλφαινόλης και της Δισφαινόλης – A, που αποτελούν ενδοκρινικούς διαταράκτες και εμφανίζονται και σε υδατικά διαλύματα. Για το σκοπό αυτό κρίνεται ωφέλιμο να αναφερθούν οι φυσικοχημικές ιδιότητες καθώς και οι πηγές προέλευσης και χρήσεις των παραπάνω ενώσεων.

1.2.1. Φυσικοχημικές ιδιότητες

Νονυλφαινόλη

Η νονυλφαινόλη (C₁₅H₂₄O, CAS Number: 25154-52-3) είναι το εμπορικά πιο σημαντικό μέλος της ομάδας των αλκυλφαινολών. Ο όρος «νονυλφαινόλη» αντιπροσωπεύει ένα μεγάλο αριθμό ισομερών ενώσεων, οι οποίες διαφέρουν ως προς τη θέση σύνδεσης της νονυλ-ομάδας με τον φαινολικό δακτύλιο και στον βαθμό διακλάδωσης που περιέχει η νονυλ-ομάδα. Η εμπορικά διαθέσιμη NP είναι κυρίως η 4-NP (παρα-NP) με ποικίλο και αδιευκρίνιστο βαθμό διακλάδωσης στην αλκυλ-ομάδα, καθώς πολύ λίγες NP ευθείας αλυσίδας είναι παρούσες ^[4].

Η μοριακή δομή της δίνεται στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Χημική δομή της NP (4-NP) ^[4].

Η νονυλφαινόλη παράγεται από τα κυκλικά ενδιάμεσα του εξευγενισμού του πετρελαίου και της ακατέργαστης πίσσας. Παρασκευάζεται με αλκυλίωση της φαινόλης με μίγμα ισομερών νονυλίων με την παρουσία ενός οξέος ως καταλύτη. Το προϊόν που προκύπτει είναι ένα μίγμα διάφορων ισομερών NP, κυρίως παραυποκατεστημένων NP με μικρές ποσότητες ορθο-υποκατεστημένων NP και ίχνη από 2,4-δινονυλφαινολών. Επιπλέον ισομερή, τα οποία αντιπροσωπεύουν τις πολυάριθμες διακλαδισμένες δομές που προκύπτουν στην νονυλ-ομάδα, συνεισφέρουν στην πολυπλοκότητα της ένωσης ^[4-5].

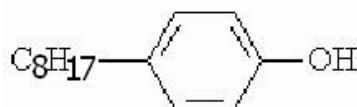
Η NP είναι ένα ελαφρώς κίτρινο παχύρρευστο υγρό με ελαφρά φαινολική οσμή, μοριακό βάρος περίπου 215,0 με 220,4, ειδική βαρύτητα 0,953 g ml⁻¹ στους 20 °C και τάση ατμών των 4,55·10⁻³ Pa ^[6]. Παρουσιάζει σημείο βρασμού 290-310 °C, αν και μερική θερμική διάσπαση λαμβάνει μέρος πριν την επίτευξη αυτής της θερμοκρασίας ^[4]. Η NP αυταναφλέγεται σε θερμοκρασία 370 °C. Η σταθερά διάστασης είναι pKa=10,7 και ο λογάριθμος του συντελεστή οκτανόλης/νερού logKow=3,80 με 4,77 ^[6]. Η διαλυτότητα της NP στο νερό εξαρτάται από το pH και έχει παρατηρηθεί ότι ισούται με: 4,6 μg l⁻¹ σε pH 5,0, 6,237 μg l⁻¹ σε pH 7,0 και 11,897 μg l⁻¹ σε pH 9,0. Η διαλυτότητα στο θαλασσινό νερό είναι 3,63 μg l⁻¹ και είναι διαλυτή σε πολλούς

οργανικούς διαλύτες ^{16]}. Υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ της διαλυτότητας της NP στο αποσταγμένο νερό και της θερμοκρασίας μεταξύ των θερμοκρασιών 2 °C (4,6 μg l⁻¹) και 25 °C (6,35 μg l⁻¹) ^{15]}. Το μίγμα των NP είναι καθαρότητας 90% w/w. Περιέχει προσμίξεις: 2-NP (5% w/w), 2,4-NP (5% w/w) ^{14]}.

Οκτυλφαινόλη

Η οκτυλφαινόλη (εικόνα 3) (C₁₄H₂₂O, CAS Number: 1806-26-4), όπως και η NP, παράγεται κατά την ατελή αποδόμηση του μη-επιφανειοδραστικού μητρικού πολυαιθοξυλιωμένου μορίου ^{17]}. Είναι ένα λευκό κρυσταλλικό στερεό ή σε μορφή νιφάδων με μοριακό βάρος 206,33 και ειδική βαρύτητα 0,961 g cm⁻³ ^{18-10]}. Έχει σημείο τήξης Σ.Τ. = 41-45 °C σημείο βρασμού Σ.Β. = 150-280 °C και σημείο αυτανάφλεξης Σ.Α. = 110-113 °C ^{18-11]}. Η διαλυτότητα στο νερό είναι 12 mg l⁻¹ και ο συντελεστής οκτανόλης:νερού είναι 4,12. Επομένως θεωρείται σχετικώς υδροφοβική οργανική ένωση ^{15, 12]}.

Κάτω από συνηθισμένες συνθήκες η OP είναι σταθερή ^{10-11]}. Σε περίπτωση φωτιάς αναφλέγεται και παράγει αέρια και ατμούς που προκαλούν ερεθισμούς και είναι τοξικοί. Αντιδρά με αναγωγικούς παράγοντες. Κατά την εισπνοή προκαλεί αίσθημα καψίματος, βήχα, ξηρό λαιμό, δυσκολία στην αναπνοή. Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα και τα μάτια προκαλεί κοκκινίλες, πόνο και εγκαύματα. Στην κατάποση προκαλεί ασυνήθιστο πόνο, αίσθημα καψίματος και περιστατικά σοκ ή κατάρρευσης ^{18, 10]}.

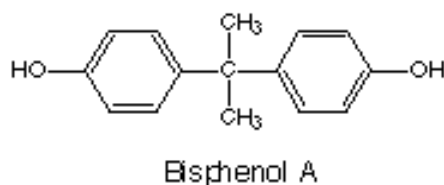


Εικόνα 3: Χημική δομή της OP (4-OP).

Δισφαινόλη-A

Η δισφαινόλη-A (C₁₅H₁₆O₂, CAS Number: 80-05-7) είναι ένα λευκό στερεό σε μορφή κρυστάλλων, νιφάδων ή σκόνης με μοριακό βάρος 228,3 και τάση ατμών $3,96 \cdot 10^{-7}$ mm Hg και σταθερά Henry $1,0 \cdot 10^{-10}$ atm m³ mol⁻¹. Η διαλυτότητά της στο νερό είναι 120-300 mg L⁻¹, έχει χαμηλή πτητικότητα ($H < 1,0 \cdot 10^{-7}$ atm m³ mol⁻¹) και η παρουσία της στο περιβάλλον δεν είναι επίμονη βάσει της γρήγορης αποδόμησής της σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων και σε υδάτινους αποδέκτες (χρόνος ημιζωής: 2,5 με 4 ημέρες). Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές η BPA έχει

μεγαλύτερη διαλυτότητα σε αλκαλικά pH εξαιτίας των σταθερών διάστασης, pKa 9,6 με 10,2. Το σημείο τήξης είναι Σ.Τ. = 150-155 °C και το σημείο βρασμού Σ.Β. = 220 °C (4 mm Hg) και 398 °C (760 mm Hg) ^[13].



Εικόνα 4: Χημική δομή της BPA ^[14].

Είναι μία οργανική ένωση που αποτελείται από δύο φαινολικούς δακτυλίους ενωμένους με γέφυρα μεθυλίου και με μεθυλικές ομάδες συνδεδεμένες με την γέφυρα (εικόνα 4).

1.2.2. Πηγές προέλευσης/Χρήσεις

Νονυλφαινόλη – Οκτυλφαινόλη

Η νονυλφαινόλη (**nonylphenol, NP**) και οκτυλφαινόλη (**octylphenol, OP**) ανήκουν στην κατηγορία των αλκυλφαινολών (**alkylphenols, APs**). Προέρχονται από την αποδόμηση των αιθοξυλιωμένων νονυλφαινολών (**NPEs**) και οκτυλφαινολών (**OPEs**), αντίστοιχα, οι οποίες ονομάζονται γενικά αιθοξυλιωμένες αλκυλφαινόλες (**alkylphenols ethoxylates, APEs**).

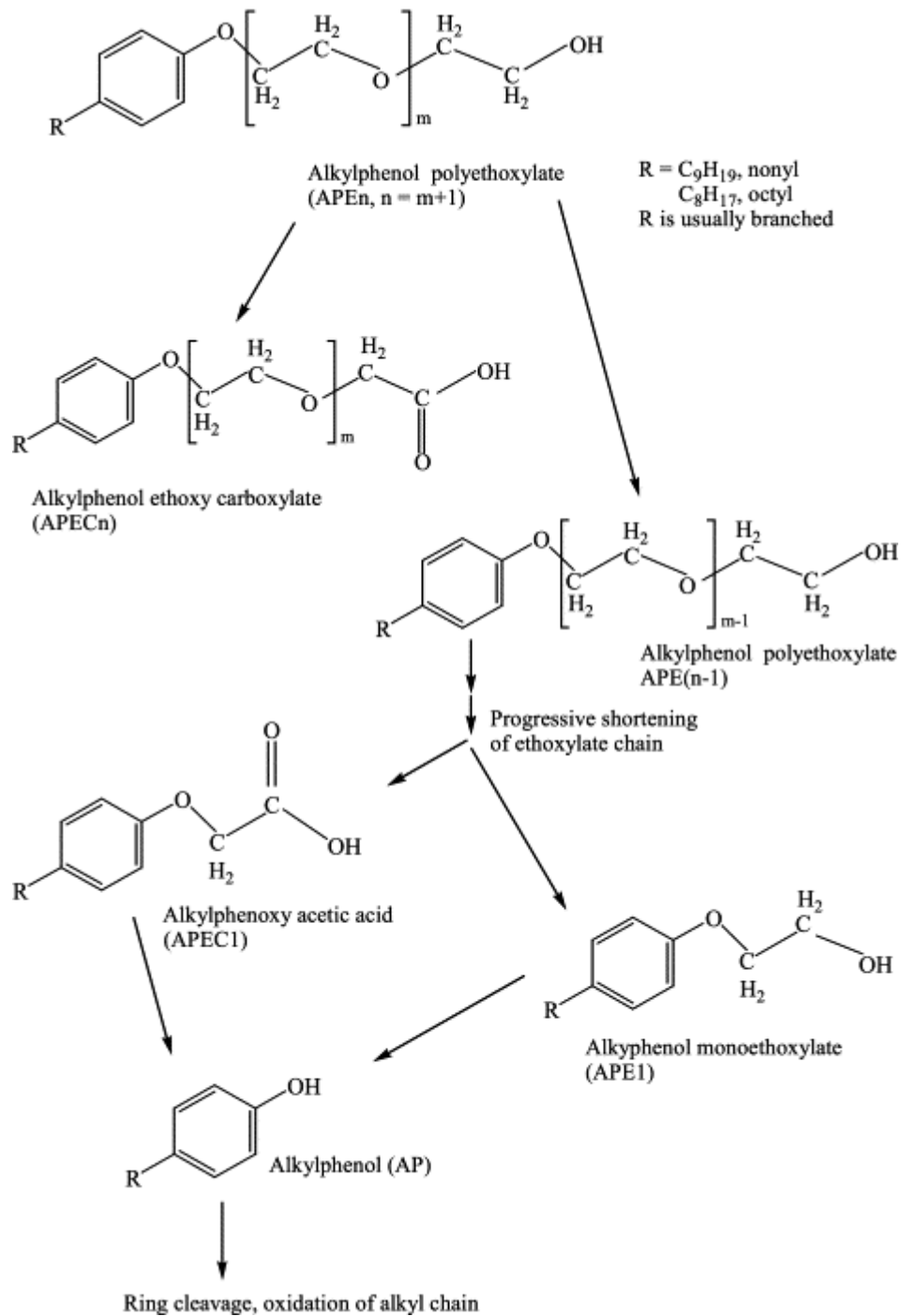
Οι APs είναι χημικές ενώσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται κυρίως για την παρασκευή των APEs, οι οποίες χρησιμοποιούνται σαν απολυμαντικά και επιφανειοδραστικά. Οι APs και APEs χρησιμοποιούνται για πάνω από 50 χρόνια. Οι APEs είναι σημαντικές σε ένα μεγάλο αριθμό βιομηχανικών διαδικασιών, περιλαμβάνοντας πολτό και χαρτί, υφαντά, επιστρώσεις, αγροτικά εντομοκτόνα, λάδι μηχανών και καύσιμα, μέταλλα και πλαστικά. Οι βιομηχανικές εφαρμογές αποτελούν το 55% των ολικών APEs στην αγορά. Το υπόλοιπο μέρος αποτελείται από βιομηχανικά προϊόντα (30%), οικιακά καθαριστικά προϊόντα (15%) και άλλες χρήσεις (<1%) ^[16-17].

Η παρουσία των NPE/OPE στο περιβάλλον είναι αποκλειστικά αποτέλεσμα ανθρώπινης παρέμβασης. Εισέρχονται στο περιβάλλον κυρίως από τις εκροές

βιομηχανιών και μονάδων επεξεργασίας αστικών λυμάτων, αλλά επίσης και από απευθείας απόθεση^[15-16]. Η παρουσία τους έχει επιβεβαιωθεί σε περιοχές κοντά σε εκροές από εργοστάσια πολτού και χαρτιού, εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων και βιομηχανικές εγκαταστάσεις^[18].

Η βιοαποδόμηση των APEs στις συμβατικές εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων πιστεύεται ότι ξεκινά με την σμίκρυνση της αιθόξυ αλυσίδας, οδηγώντας σε APEs μικρής αλυσίδας που περιέχουν μία ή δύο αιθόξυ μονάδες (εικόνα 5). Η πλήρης αποαιθοξυλίωση προς σχηματισμό των APs έχει παρατηρηθεί μόνο κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Στη συνέχεια, μέσω της οξειδωσης της αιθοξυλικής αλυσίδας, παράγονται κυρίως αλκυλφαινόξυ αιθόξυ οξικό οξύ και αλκυλφαινόξυ οξικό οξύ. Ωστόσο, έρευνες έχουν δείξει ότι οι μεταβολίτες των APEs αποδομούνται ευκολότερα κάτω από αερόβιες συνθήκες παρά αναερόβιες. Ο χρόνος ημίσειας ζωής των NP σε θαλασσινό νερό είναι 58 ημέρες ενώ σε αερόβιο θαλασσινό νερό παρουσία ιζήματος και στους 11 °C είναι 35 ημέρες^[16].

Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 5) δίνονται οι κυριότερες οδοί αποδόμησης των APEs προς APs.



Εικόνα 5: Οδοί αποδόμησης των APEs ^[16]

Δισφαινόλη-Α

Η δισφαινόλη-Α (**BisPhenol-A**, **BPA**) χρησιμοποιείται στην παρασκευή επόξυ ρητινών και πολυκαρβονικών πλαστικών για πάνω από τέσσερις δεκαετίες ^[19-20]. Στο περιβάλλον προκύπτει λόγω του γεγονότος ότι αποδεσμεύεται από τα πλαστικά τα

οποία καθαρίζονται με σκληρά απορρυπαντικά ή που χρησιμοποιούνται για να περιέχουν όξινα ή υψηλής θερμοκρασίας υγρά.

Το πολυκαρβονικό πλαστικό είναι ένα ελαφρύ και υψηλής απόδοσης πλαστικό το οποίο έχει μοναδική ισορροπία σκληρότητας, οπτικής καθαρότητας, υψηλής θερμικής αντίστασης και εξαιρετικής ηλεκτρικής αντίστασης. Εξαιτίας αυτών των ιδιοτήτων, το πολυκαρβονικό χρησιμοποιείται σε μεγάλη ποικιλία γνωστών προϊόντων που περιλαμβάνουν μέσα αποθήκευσης ψηφιακών δεδομένων (CDs, DVDs), ηλεκτρικό και ηλεκτρονικό εξοπλισμό, αυτοκίνητα, εξοπλισμό ασφάλειας αθλητών, ανακυκλώσιμες συσκευασίες φαγητού και ποτών, και πολλά άλλα προϊόντα. Επιπλέον, μερικά πολυκαρβονικά που χρησιμοποιούνται σε οδοντικές θεραπείες περιέχουν BPA ^[19-20].

Οι επόξυ ρητίνες έχουν πολλές χρήσεις περιλαμβάνοντας μηχανικές εφαρμογές όπως ηλεκτρικά ελάσματα, σύνθετα, βαφές και κόλλες, καθώς και σε μια ποικιλία προστατευτικών επικαλυμμάτων. Χρησιμοποιούνται κυρίως σαν βερνίκια για να επικαλύψουν μεταλλικά προϊόντα όπως κονσέρβες φαγητού, καπάκια μπουκαλιών και σωλήνες παροχής νερού εξαιτίας του εξαιρετικού συνδυασμού σκληρότητας, συγκόλλησης, σχηματοποίησης και χημικής αντίστασης ^[19-20].

2. Τοξικότητα

Νονυλφαινόλη-Οκτυλφαινόλη

Έχει αναγνωριστεί η αυξημένη τοξικότητα που προκαλούν στο υδατικό περιβάλλον οι υδρόφοβοι μεταβολίτες έναντι των αρχικών επιφανειοδραστικών ουσιών. Έρευνες έχουν δείξει ότι οι μεταβολίτες των APs μιμούνται τις φυσικές ορμόνες παρεμβάλλοντας στον ενδοκρινικό δέκτη ^[16]. Ιδιαίτερη ανησυχία προκαλεί η υδατική τοξικότητα των APs (OP και NP), αν και με την υδρόφοβη φύση τους είναι πολύ πιθανό να παραμείνουν στη λάσπη των αποβλήτων. Κάθε AP που καταλήγει στα επεξεργασμένα λύματα έρχεται σε επαφή με την αιωρούμενη μάζα και τελικά με το ίζημα.

Τα δεδομένα από την υδατική τοξικότητα της NP δείχνουν επίδραση σε συγκεντρώσεις που είναι υψηλότερες από αυτές που βρίσκονται στο περιβάλλον, με παρατηρούμενες τιμές για LC₅₀ στην περιοχή από 0,2 μέχρι μεγαλύτερες των 5 mg l⁻¹ ^[21]. Η NP και η OP παρουσιάζουν οξεία τοξικότητα στα ψάρια (17-3000 μg l⁻¹), τα

ασπόνδυλα ($20-3000 \mu\text{g l}^{-1}$) και τα άλγη ($27-2500 \mu\text{g l}^{-1}$). Στα τεστ της χρόνιας τοξικότητας η μη-παρατηρούμενες αποτελεσματικές συγκεντρώσεις (No Observed Effective Concentration, **NOEC**) ήταν στις τιμές $6 \mu\text{g l}^{-1}$ για τα ψάρια και $3,7 \mu\text{g l}^{-1}$ για τα ασπόνδυλα ^[22].

Υπάρχει αύξηση της τοξικότητας στις NPEs και OPEs με τη μείωση της αιθόξυ αλυσίδας. Οι NPECs και OPECs (πολυαιθοξυκαρβοξυλιωμένες νονυλ- και οκτυλφαινόλες) είναι λιγότερο τοξικές από τις αντίστοιχες APEs και έχουν οξεία τοξικότητα παρόμοια τις APEs με 6-9 αιζόξυ μονάδες ^[22].

Δισφαινόλη-A

Η BPA είναι “ελαφρώς προς μέτρια” τοξική ($EC_{50} = 1000 \mu\text{g l}^{-1}$ για τα άλγη) και έχει χαμηλό δυναμικό βιοσυσώρευσης στους υδάτινους οργανισμούς (BCFs 5-68). Η χρόνια NOEC για το είδος *Daphnia magna* είναι $>3146 \mu\text{g l}^{-1}$. Οι συγκεντρώσεις στα επιφανειακά νερά είναι τουλάχιστον μία με μερικές μονάδες μικρότερες από τις χρόνιες επιδράσεις, όπου αρκετές είναι και κάτω από τα όρια ανίχνευσης ^[13].

Στους υδάτινους μικροοργανισμούς (είδη *Pseudomonas*) η BPA προκαλεί 10% μείωση της κυτταρικής ανάπτυξης και αναχαίτιση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Έρευνες για το άλγος *Selanastrum capricornutum* έδωσαν αποτέλεσμα 96-ωρών χρόνια NOEC $1170 \mu\text{g l}^{-1}$. Για τα ασπόνδυλα η BPA θεωρείται “ελαφρώς προς μέτρια” τοξική, με NOEC για το είδος *Daphnia magna* να είναι $>3146 \mu\text{g l}^{-1}$. Για τα ψάρια γλυκού και αλμυρού νερού είναι “ελαφρώς προς μέτρια” τοξική. Από τα ψάρια του γλυκού νερού το είδος *Oncorhynchus mykiss* (είδος σολομού) παρουσιάζει 48-ωρών LC_{50} μεταξύ $5000-7000 \mu\text{g l}^{-1}$ ^[13].

Η BPA είναι λιγότερο τοξική για τους μικροοργανισμούς σε σχέση με τα άλγη, ψάρια και ασπόνδυλα. Επιπλέον, τα αποτελέσματα τοξικότητας παρουσίαζαν μεγαλύτερη ευαισθησία για τα ασπόνδυλα και τα ψάρια σε σχέση με τους μικροοργανισμούς και μικρότερη σε σχέση με τα άλγη. Γενικά, οι μετρούμενες οξείες και χρόνιες υδάτινες τοξικότητες είναι μία με οκτώ φορές μεγαλύτερες από τις μετρούμενες συγκεντρώσεις.

3. Τύχη στο υδατικό περιβάλλον

Νονυλφαινόλη-Οκτυλφαινόλη

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των APs δείχνουν ότι είναι υδροφοβικές ενώσεις και τείνουν να βιοσυσσωρεύονται στους λιπώδεις ιστούς των οργανισμών στο περιβάλλον. Οι παράγοντες BCFs και BAFs για τα άλγη, φυτά, ασπόνδυλα και ψάρια κυμαίνονται από 0,9-3400 ^[22], ενώ συγκεκριμένα για τα διάφορα είδη ψαριών οι τιμές των BCF κυμαίνονται από 21-1300 για την NP και από 267-471 για την OP. Οι διαφορές αυτές στις τιμές των BCFs για την NP και την OP στα ψάρια οφείλονται στις διαφορετικές μεταβολικές τους ιδιότητες, τη λειτουργία των βραγχίων, κ.α ^[23]. Έκθεση σε APs σε υδάτινους δέκτες οδηγεί σε ταχεία σύζευξη και εξάλειψη των χημικών μέσω της ηπατο/χολικής οδού ενώ μεγάλες ποσότητες από τις μητρικές ενώσεις μπορούν να συσσωρευτούν σε διάφορους ιστούς των ψαριών ^[23].

Δισφαινόλη-A

Η BPA δεν αναμένεται να είναι επίμονη στο περιβάλλον, αποδομείται εύκολα σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων και επιφανειακά νερά και φωτοοξειδώνεται σαν αέρια BPA ή εναποτίθεται σαν σωματίδια από την ατμόσφαιρα ^[13].

Αρκετά βακτήρια που έχουν την ικανότητα να βιοαποδομούν την BPA βρίσκονται σε νερά ποταμών και μονάδες επεξεργασίας λυμάτων. Στις εκροές βιολογικών καθαρισμών έχει παρατηρηθεί απομάκρυνση >90 % και σε ποταμούς οι χρόνοι ημίσειας ζωής ήταν μικρότεροι των 5 ημερών. Μεγάλη επίδραση στην αποδόμηση της BPA έχει και η θερμοκρασία. Νερά ποταμών στους 30 και 20 °C παρουσίασαν χρόνους ημίσειας ζωής 4 και 7 ημέρες αντίστοιχα, ενώ στους 4 °C μόνο το 20 % της BPA αποδομήθηκε σε διάστημα 20 ημερών. Επιπλέον, μεγάλη σημασία παίζουν και οι αερόβιες ή οι αναερόβιες συνθήκες. Επιμολυσμένο δείγμα με BPA παρουσίασε γρήγορη απομάκρυνση >90 % ενώ κάτω από αναερόβιες συνθήκες η απομάκρυνση σε διάστημα 10 ημερών ήταν <10 %. Επομένως, τα αναερόβια βακτήρια έχουν περιορισμένη με ανύπαρκτη βιοαποδομητικότητα και σαν αποτέλεσμα η BPA παρουσιάζεται επίμονη επί μακρόν διάστημα κάτω από αναερόβιες συνθήκες ^[14].

Τα άλγη παρουσιάζουν επίσης την ικανότητα απομάκρυνσης της BPA. Η απομάκρυνση ευνοείται κάτω από συνθήκες φωτός έως και 63%.

4. Ισχύουσα νομοθεσία

Η NP έχει ταξινομηθεί ως «επικίνδυνη ουσία προτεραιότητας» στην οδηγία 2000/60/EK του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 23^{ης} Οκτωβρίου 2000. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή οδηγία 2003/53/EK αξιολογήθηκαν οι κίνδυνοι για το περιβάλλον από την NP και την αιθοξυλιωμένη NP (NPE). Απόφασή της είναι ότι «για την περαιτέρω προστασία του περιβάλλοντος, η διάθεση στην αγορά και η χρήση NP και NPE πρέπει να περιορισθούν σε συγκεκριμένες χρήσεις, οι οποίες έχουν ως συνέπεια απορρίψεις, εκπομπές ή διαρροές στο περιβάλλον. Εντούτοις, ο περιορισμός σχετικά με τα βοηθητικά συνθέσεως στα φυτοφάρμακα και βιοκτόνα δεν θα πρέπει να θίγει την ισχύ των υφιστάμενων εθνικών εγκρίσεων φυτοφαρμάκων ή βιοκτόνων προϊόντων που περιέχουν NPE ως βοηθητικό συνθέσεως, οι οποίες έχουν χορηγηθεί πριν από την έναρξη ισχύος της παρούσας οδηγίας, και μέχρις ότου αυτές εκπνεύσουν.»

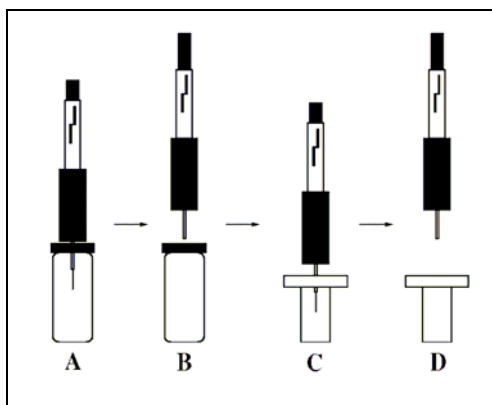
Σε παράρτημα της παρούσας οδηγίας αναφέρονται ακόμα τα εξής: «NP και NPE: δεν επιτρέπεται να διατίθεται στην αγορά ή να χρησιμοποιείται ως ουσία ή ως συστατικό παρασκευασμάτων σε συγκεντρώσεις ίσες ή μεγαλύτερες από 0,1% κατά βάρος για τους ακόλουθους σκοπούς:

1. βιομηχανικό και επαγγελματικό καθαρισμό, εκτός:
 - από ελεγχόμενα κλειστά συστήματα στεγνού καθαρισμού στα οποία το υγρό καθαρισμού ανακυκλώνεται ή αποτεφρώνεται,
 - από συστήματα καθαρισμού με ειδική επεξεργασία στα οποία το υγρό καθαρισμού ανακυκλώνεται ή αποτεφρώνεται.
2. οικιακό καθαρισμό.
3. κατεργασία κλωστοϋφαντουργικών ειδών και δερμάτων, εκτός:
 - από την κατεργασία κατά την οποία δεν υπάρχει έκλυση στα λύματα,
 - από συστήματα με ειδική κατεργασία όπου το χρησιμοποιούμενο νερό υφίσταται προεπεξεργασία ώστε να αφαιρείται πλήρως το οργανικό κλάσμα πριν από τη βιολογική επεξεργασία των λυμάτων (απολίπανση δέρματος προβάτων).
4. γαλακτοματοποιητής στην εμβάπτιση θηλών στη γεωργία.
5. κατεργασία μετάλλων, εκτός:

- από τη χρήση σε ελεγχόμενα κλειστά συστήματα στα οποία το υγρό καθαρισμού ανακυκλώνεται ή αποτεφρώνεται.
6. βιομηχανία χαρτοπολτού και χαρτιού.
 7. καλλυντικά.
 8. άλλα προϊόντα προσωπικής φροντίδας, εκτός:
 - από σπερμοκτόνα.
 9. βοηθητικά συνθέσεως σε φυτοφάρμακα και βιοκτόνα προϊόντα.

5. Μικροεκχύλιση

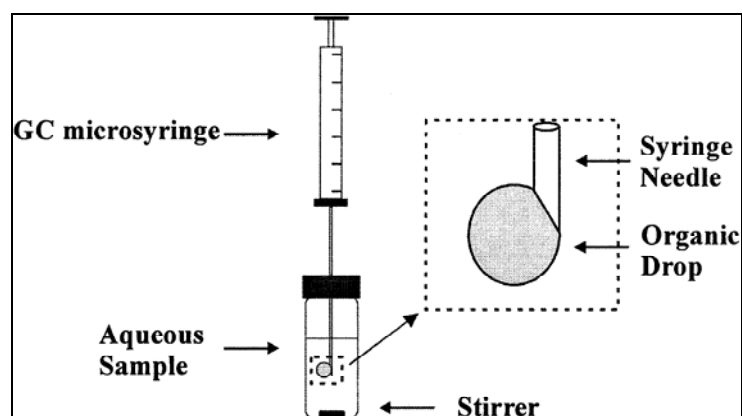
Η ανάγκη για την εύρεση πιο γρήγορων και φθηνών τεχνικών εκχύλισης των ουσιών από το υπό εξέταση δείγμα οδήγησε στην ανάπτυξη των τεχνικών της μικροεκχύλισης. Οι τεχνικές μικροεκχύλισης μπορούν να θεωρηθούν ως μη διεξοδικές μέθοδοι προετοιμασίας του δείγματος, οι οποίες βασίζονται στη χρήση ενός πολύ μικρού όγκου από το εκχυλιστικό μέσο, συγκρινόμενες ως προς τον όγκο του δείγματος ^[24]. Χαρακτηρίζονται δε από τη βαρυσήμαντη συμβολή τους στη βελτίωση της απόδοσης ως προς την προετοιμασία του δείγματος, υιοθετώντας μια απλή και χρονικά αποδοτική προσέγγιση. Παρά τις διάφορες τεχνικές μικροεκχύλισης που έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία, η εμφάνιση της Μικροεκχύλισης Στερεής Φάσης (Solid-Phase Microextraction = SPME) το 1990 ^[25] αποτέλεσε σημείο αναφοράς (εικόνα 6). Η επακόλουθη βιομηχανική διάδοση της SPME τεχνικής σηματοδότησε την απαρχή μιας έντονης ερευνητικής δραστηριότητας στο πεδίο αυτό. Με το πέρασ ορισμένων ετών, προτάθηκε στη βιβλιογραφία η μικροεκχύλιση με διαλύτη, γνωστή και ως Μικροεκχύλιση Υγρής Φάσης (Liquid-Phase Microextraction = LPME) ^[26-27]. Η καινοτομία της LPME τεχνικής συνίσταται στην ελαχιστοποίηση της παραδοσιακής Υγρής – Υγρής Εκχύλισης, με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του λόγου των όγκων της φάσης δέκτη προς τη φάση δότη ^[28]. Τα πλεονεκτήματά τους είναι ότι συνδυάζουν ταχύτητα, απλότητα, χαμηλό κόστος και είναι φιλικές προς το περιβάλλον. Επιπλέον, με τις τεχνικές αυτές καθίσταται πλέον δυνατή η ανάλυση ρυπαντών σε πραγματικά περιβαλλοντικά δείγματα όπου συνήθως απαντούν σε ίχνη.



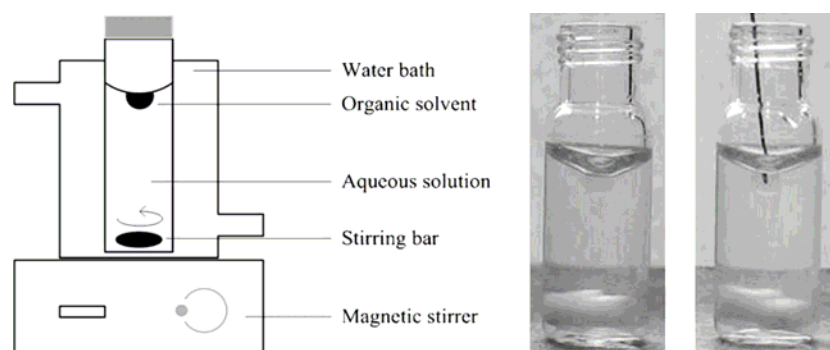
Εικόνα 6: Χειροκίνητη δειγματοληψία και ανάλυση με SPME με ίνα. Ο χρήστης πρέπει να (A) να διαπεράσει στο δείγμα και να εκθέσει την ίνα σ' αυτό, (B) να επαναφέρει την ίνα όταν τελειώσει η δειγματοληψία (C) να εισαγάγει την ίνα στον είσοδο της χρωματογραφικής στήλης για τον κατάλληλο χρόνο εκρόφισης των ενώσεων και (D) να εξάγει την ίνα για την επόμενη ανάλυση ^[24].

Αρχικά, 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) ^[28] (εικόνα 7). Αυτή η βασική μεθοδολογία αναπτύχθηκε περαιτέρω και από έκτοτε διάφορες πειραματικές προσεγγίσεις υιοθετήθηκαν. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η δυνατότητα χρήσης των μικροσταγόνων για την εκχύλιση των κύριων ενώσεων από υδατικά διαλύματα. Η πρώτη προσέγγιση που ακολούθησε τη μέθοδο αυτή ονομάστηκε Μικροεκχύλιση Απευθείας Αιωρούμενου Σταγονιδίου (Directly Suspended Droplet Microextraction, DSDME) ^[29] (εικόνα 8), 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, εξακολουθούσε να υφίσταται στη μορφή μονής σταγόνας. Με την παρέλευση ενός προκαθορισμένου χρονικού διαστήματος η οργανική φάση δέκτης απομακρύνθηκε με τη βοήθεια μικροσύριγγας και στη συνέχεια 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 ^[30]. Πρόσφατα προτάθηκε μια ελαφριά παραλλαγή της πιο πάνω μεθόδου υπό την ονομασία Υγρή – Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME) ^[31] (εικόνα 9). Σε αυτή την παραλλαγή ένας διαλύτης διασκορπίσματος μη υδατοδιαλυτός καθώς και μία οργανική φάση, εγχύθηκαν στο διάλυμα

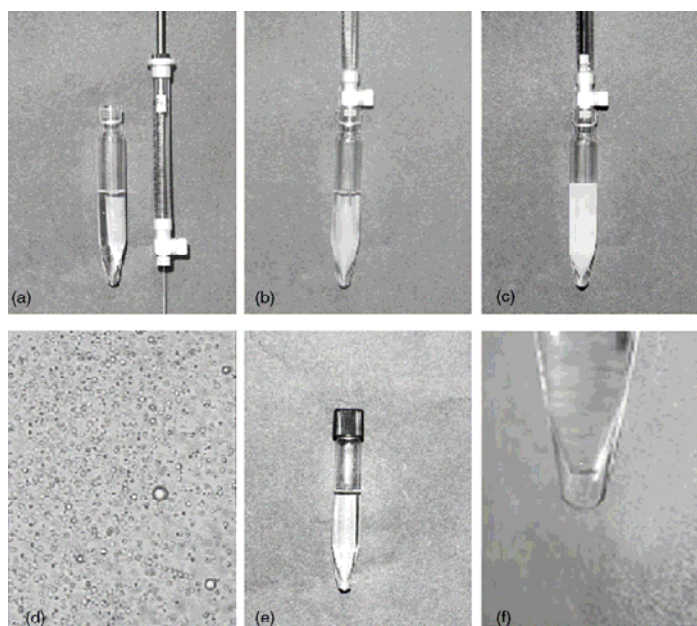
δημιουργώντας ένα θολό διάλυμα. Στη συνέχεια το μίγμα υπέστη φυγοκέντρωση με αποτέλεσμα τα διασπαρμένα σωματίδια να καθιζάνουν στη βάση του κωνικού φιαλιδίου. Εν κατακλείδι, μια νέα μέθοδος μικροεκχύλισης μονής σταγόνας προτάθηκε, βασισμένη στη στερεοποίηση της επιπλέουσας μικροσταγόνας^[32] (εικόνα 10). 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 ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα λαμβάνεται προς ανάλυση.



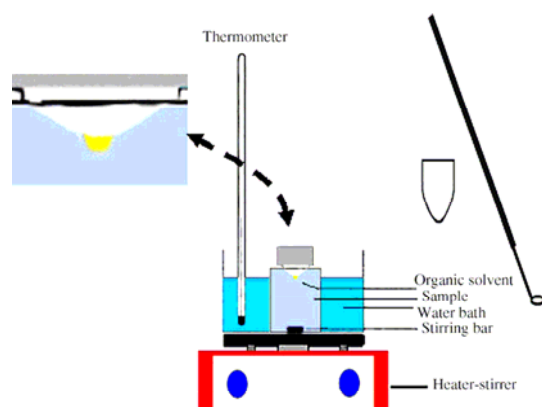
Εικόνα 7: Σχηματική παράσταση της SDME^[28].



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της DSDME: η πειραματική διάταξη, η εκχύλιση και η ανάκτηση της μικροσταγόνας για περαιτέρω ανάλυση^[29].



Εικόνα 9: Τα διάφορα βήματα της DLLME, a) πριν την εισαγωγή του μίγματος του διαλύτη διασποράς (ακετόνη) και του διαλύτη εκχύλισης (C_2Cl_4) μέσα στο διάλυμα, b) έναρξη της εισαγωγής του μίγματος των διαλυτών, c) ολοκλήρωση της εισαγωγής των διαλυτών, d) μεγέθυνση στην οποία φαίνονται τα σωματίδια του C_2Cl_4 σε νεφελώδη κατάσταση, e) μετά την φυγοκέντρηση και f) μεγενθυμένη εικόνα της φάσης που έχει καθιζάνει ^[31].



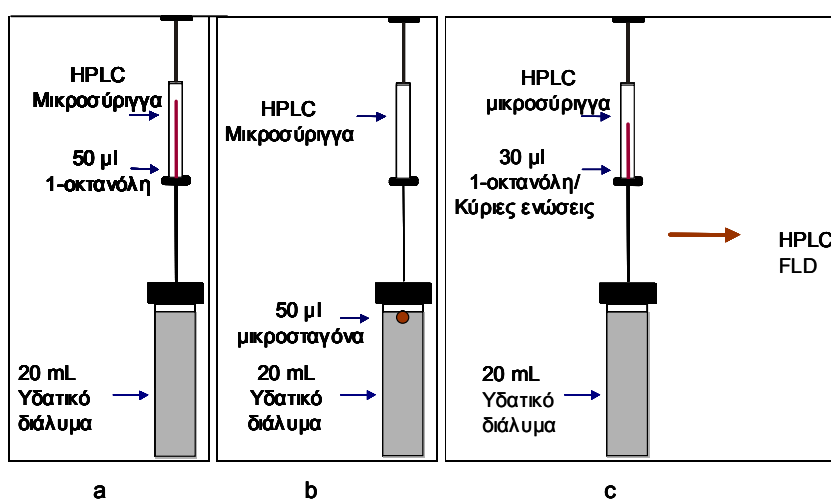
Εικόνα 10: Σχηματική παράσταση της συσκευής LPME με ρευστοποίηση της επιπλέουσας σταγόνας ^[32].

5.1. Προτεινόμενη μέθοδος μικροεκχύλισης: Καινοτόμος μέθοδος μικροεκχύλισης με ελεύθερη σταγόνα (Free Drop Microextraction, FDME)

Στην παρούσα εργασία γίνεται για πρώτη φορά η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μίας καινούριας μεθόδου μικροεκχύλισης η οποία ονομάζεται μικροεκχύλιση με ελεύθερη σταγόνα (Free Drop MicroExtraction = FDME) (εικόνα 11). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή η ουσία εκχυλίζεται από την υδατική φάση κατευθείαν μέσα στην οργανική φάση. Η μέθοδος αυτή αποδείχτηκε ένα γρήγορο, απλό και ευαίσθητο μέσο

προσυγκέντρωσης προκειμένου για την ανάλυση αλκυλφαινολών και της δισφαινόλης-A. Παρόλο που αρκετές έρευνες έχουν γίνει για την ανάλυση αυτών των ενώσεων χρησιμοποιώντας είτε LPME ή SPME συνδεδεμένες με υγρή ή αέρια χρωματογραφία [33-34], 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 προετοιμασία του δείγματος.

Σύμφωνα με την FDME μία μικροσταγόνα ενός μη υδατοδιαλυτού οργανικού διαλύτη μένει ελεύθερη σε ορισμένο όγκο υδατικού διαλύματος που περιέχει τις κύριες ενώσεις και ο οποίος περιέχεται σε ένα φιαλίδιο. Το κλειστό φιαλίδιο το οποίο περιέχει τις δύο φάσεις και τις ενώσεις που μελετούνται αναδεύεται με τη βοήθεια συσκευής vortex οδηγώντας στη διάσπαση της οργανικής σταγόνας σε μικροσταγόνες παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο ταχύτερες κινητικές εκχύλισης των κύριων ενώσεων. 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.



Εικόνα 11: Σχηματική παράσταση της προτεινόμενης τεχνικής μικροεκχύλισης, FDME, a) πριν την εισαγωγή της μικροσταγόνας, b) εισαγωγή της μικροσταγόνας, c) ανάκτηση της σταγόνας στη μικροσύριγγα μετά την ανάδευση/φυγοκέντρωση του μίγματος.

5.3.1. Βελτιστοποίηση της μεθόδου. Παράμετροι που επηρεάζουν την FDME.

5.3.1.1. Επιλογή του οργανικού διαλύτη

Η επιλογή του οργανικού διαλύτη αποτελεί πολύ σημαντικό βήμα στην βελτιστοποίηση της μεθόδου της μικροεκχύλισης. Ο οργανικός διαλύτης-δέκτης των κύριων ενώσεων 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 των ενώσεων σε αυτόν έναντι του υδάτινου διαλύματος.

5.3.1.2. Επιλογή της μεθόδου ανάδευσης και της ταχύτητας

Η ανάδευση του διαλύματος χρησιμοποιείται για την επιτάχυνση της εκχύλισης των ενώσεων από την υδατική φάση στην οργανική για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευσή τους. 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 πρόνοια πρέπει να ληφθεί για την αντίδραση του διαλύματος με τον μαγνήτη (πλαστικός ή γυάλινος).

5.3.1.3. 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.

5.3.1.4. 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.

5.3.1.5. Προσθήκη άλατος

Ανάλογα με τη φύση των ενώσεων που μελετούνται 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.

5.3.1.6. 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.

6. Χρωματογραφία

Οι μέθοδοι μικροεκχύλισης ακολουθούνται-συνδυάζονται και με μία μέθοδο διαχωρισμού του μίγματος που προκύπτει προκειμένου για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των κύριων ενώσεων. Οι κυριότερες διαχωριστικές μέθοδοι που εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό των αλκυλφαινολών και της δισφαινόλης-A είναι αυτές της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) ^[34-37] και της αέριας χρωματογραφίας (GC) ^[33, 36, 38-43].

6.1. HPLC

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης αποτελεί μια από τις πλέον αξιόπιστες μεθόδους ενόργανης ανάλυσης, με ευρύτατη εφαρμογή στην επίλυση αναλυτικών και περιβαλλοντικών δειγμάτων.

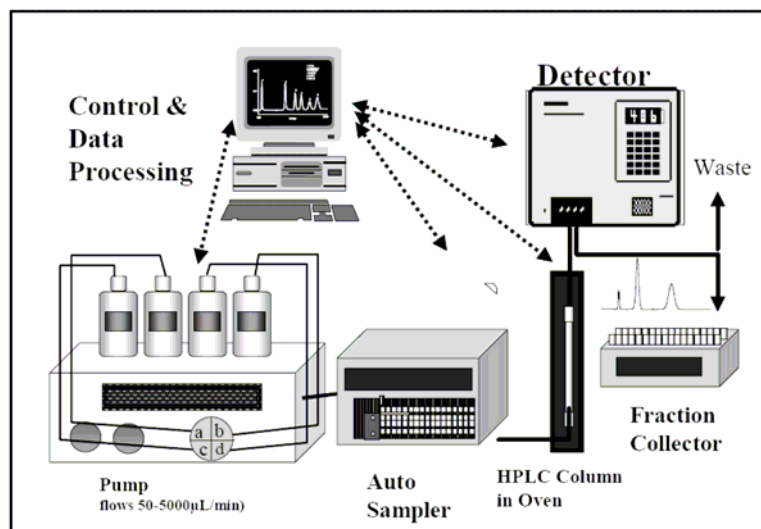
Στην εικόνα 12 δίνεται η διάταξη που χρησιμοποιείται στην HPLC.

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 πίεσεως στο σύστημα ροής.

Το τελευταίο τμήμα της διάταξης HPLC είναι ο ανιχνευτής, ο οποίος μετρά μία χαρακτηριστική ιδιότητα του διαχωριζόμενου συστατικού, όπως π.χ. η απορρόφηση στο UV, ο φθορισμός, η ηλεκτρική αγωγιμότητα και ανάλογα με τη συγκέντρωσή του, δίνει το κατάλληλο σήμα. Στην περίπτωση των αλκυλοφαινολών και της δισφαινόλης-A η HPLC έχει συνδυαστεί με ανιχνευτή φθορισμού (FLD) ^[33, 35-38] και υπεριώδους (UV) ^[37].

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

Η ανάλυση της HPLC μπορεί να είναι κανονικής φάσεως ή αντίστροφης. Στην περίπτωση της αντίστροφης φάσης η κινητή φάση είναι πολικός διαλύτης όπως νερό, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, τετραϋδροφουράνιο ή μίγμα αυτών. Η στατική φάση είναι υδρογονάνθρακες με 18 (C₁₈H₃₈) ή 8 (C₈H₁₈) 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 στερεού υποστρώματος, συνήθως silica gel.



Εικόνα 12: Διάγραμμα λειτουργίας μιας διάταξης HPLC.

Πειραματικό μέρος

1. Υλικά

1.1. Αντιδραστήρια

Τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία των δειγμάτων προς ανάλυση είναι τα παρακάτω:

1. δισφαινόλη-A (BPA) του οίκου Aldrich
2. οκτυλφαινόλη (OP) του οίκου Aldrich
3. technical mixture νονυλφαινόλης (NP) του οίκου Riedel-de-Haën
4. ακετονιτρίλιο και μεθανόλη LiChrosolv του οίκου Merck με βαθμό καθαρότητας για Υγρή Χρωματογραφία.

Τα πυκνά πρότυπα ήταν μεθανολικά διαλύματα των 500 mg l⁻¹ για την BPA και την OP και 1000 mg l⁻¹ για την NP. Τα πρότυπα εργασίας ετοιμάζονταν καθημερινά στα επιθυμητά επίπεδα συγκεντρώσεων και χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο (δισαπιονισμένο) νερό από σύστημα καθαρισμού ύδατος EASYpureRF, το οποίο προμηθεύτηκε από την Barnstead/Thermolyne.

1.2. Όργανα – 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. HPLC system της Shimadzu
4. αναδευτήρας τύπου vortex (Reax Control, Heidolph, Germany)
5. φυγόκεντρος (Labofuge 400 Heraeus, Kendro Laboratory Products, Germany)

1.3. Χαρακτηριστικά υδατικών περιβαλλοντικών δειγμάτων

Τα δείγματα από ποταμό συλλέχτηκαν από τον Ποταμό Κοιλίαρη των Χανίων – Κρήτης (pH 7,5, Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (COD) = 20 mg l⁻¹, Ολικά Διαλυμένα Στερεά (TDS) = 100 mg l⁻¹). Τα δείγματα εκροής βιολογικού καθαρισμού

συλλέχθηκαν από τη Μονάδες Επεξεργασίας Αστικών Λυμάτων της πόλης των Χανίων (pH 7,6, COD = 15 mg l⁻¹, TDS = 508 mg l⁻¹) και του Ρεθύμνου (pH 8,0, COD = 68 mg l⁻¹, TDS = 780 mg l⁻¹) οι οποίες βρίσκονται στη βοριο-δυτική πλευρά της Κρήτης, εξυπηρετώντας περίπου 70.000 και 25.000 κατοίκους αντίστοιχα.

2. Μέθοδος FDME

Σύμφωνα με τη μέθοδο FDME 50 μL οκτανόλης εισαχθήκανε σε 20 mL υδατικού δείγματος επιμολυσμένου με γνωστή συγκέντρωση όλων των κύριων ενώσεων τοποθετημένων σε γυάλινα φιαλίδια φυγοκέντρου. Σαν αποτέλεσμα αυτής της εισαγωγής, σχηματίστηκε μια μικροσταγόνα της οργανικής φάσης στην επιφάνεια της υδατικής. Στη συνέχεια το μίγμα καλύφθηκε με καπάκια και septa καλυμμένα με αλουμινόχαρτο, αναδεύτηκε με τη χρήση vortex αναδευτήρα για 2 min στις 2500 rpm και φυγοκεντρήθηκε για το διαχωρισμό των δύο φάσεων και την ανάκτηση 30 μL της οργανικής φάσης με τη βοήθεια μικροσύριγγας. Στη συνέχεια η ανακτημένη ποσότητα αναλύθηκε σε σύστημα HPLC. Κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης της μεθόδου, όλες τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

3. Αναλύσεις με HPLC

Για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση των κύριων ενώσεων χρησιμοποιήθηκε σύστημα HPLC κατασκευασμένο από τη Shimadzu και το οποίο περιλαμβάνει μία αντλία δύο διαλυτών και ένα ανιχνευτή φθορισμού (FLD). Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Nucleosil 100-5 C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μm, Macherey-Nagel, Duren, Germany). Η κινητή φάση ήταν μίγμα σε αναλογία 80:20 ακετονιτρίλιο:υπερκάθαρο νερό, με ισοκρατική έκλυση και ροή 1 mL/min. Ο όγκος του δείγματος προς ανάλυση ήταν 30 μL και η ανίχνευση επιτεύχθηκε με ανιχνευτή φθορισμού με μήκος κύματος διέγερσης τα 277 nm και εκπομπής τα 300 nm^[13, 34]. Η θερμοκρασία του φούρνου ήταν 27 °C και ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 15 min.

Πειραματικά αποτελέσματα και συζήτηση

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.

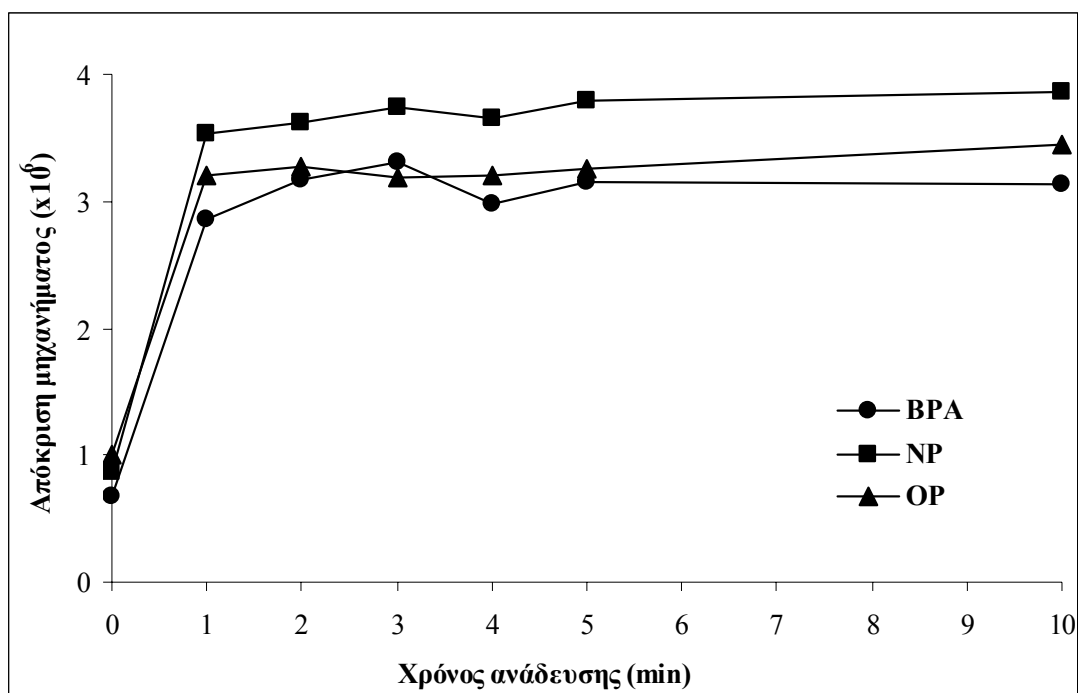
1. Επιλογή του οργανικού διαλύτη

Αρχικά, εξετάστηκαν έξι μη υδατοδιαλυτοί διαλύτες (ονομαστικά: 1-οκτανόλη, τολουόλιο, *n*-εξάνιο, οκτάνιο και κυκλοεξάνιο) 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 mL οργανικού διαλύτη εισάγονταν σε 20 mL διαλύματος απιονισμένου νερού επιμολυσμένου με 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ σε OP και BPA και 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ σε NP. 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 συνέχεια, 30 mL από την οργανική φάση συλλέχθηκαν με τη βοήθεια μικροσύριγγας και χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση με HPLC. Από τους οργανικούς διαλύτες που εξετάστηκαν, μόνο η 1-οκτανόλη είχε την ικανότητα να σχηματίζει μονή σταγόνα στην επιφάνεια του υδατικού διαλύματος καθώς οι υπόλοιποι διαλύτες διαχέονταν στην επιφάνεια του διαλύματος κάνοντας την συλλογή τους αδύνατη. Στο παρελθόν έχει διαπιστωθεί η ικανότητα της 1-οκτανόλης να εκχylίζει τις APs αποτελεσματικότερα συγκρινόμενη με τα ιονικά υγρά και τον τετραχλωράνθρακα ¹³⁴. Συνεπώς, η 1-οκτανόλη επιλέχθηκε ως διαλύτης εκχύλισης για τις υπόλοιπες αναλύσεις.

2. Επιλογή του χρόνου ανάδευσης

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου ανάδευσης στην FDME (διάγραμμα 1) με τη χρήση του vortex. Χρόνοι ανάδευσης στο vortex που

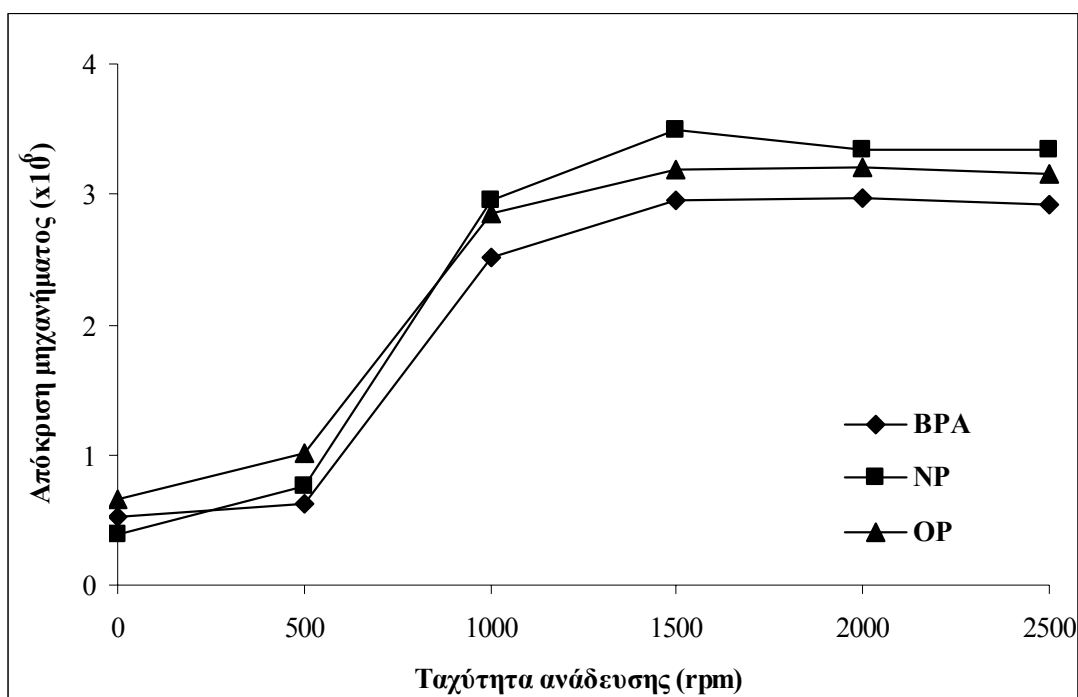
κυμαίνονταν από 0 έως 10 min εξετάστηκαν. 50 μL 1-οκτανόλης εισαχθήκανε σε 20 mL υδατικού διαλύματος επιμολυσμένου με $1 \mu\text{g l}^{-1}$ σε OP και BPA και $10 \mu\text{g l}^{-1}$ σε NP. Μετά την ανάδευση του μίγματος με τη βοήθεια vortex (2 min, 2500 rpm) και φυγοκέντρηση (2 min, 3500 rpm), 30 μL από την οκτανολική φάση συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση στην HPLC. Το πειραματικό σημείο 0 min ανταποκρίνεται στην εκχύλιση χωρίς ανάδευση αλλά μόνο λόγω της φυγοκέντρησης. Η ιδέα της μικροεκχύλισης με χρήση φυγοκέντρου και μόνο εισάχθηκε από τον Fang et al.^[30]. Γενικά, κατά τη φυγοκέντρηση, δρουν δυο αντίθετες δυνάμεις: η καθίζηση των μορίων λόγω της φυγοκέντρου δύναμης του περιστροφέα και η διάχυση^[36] η οποία, στην παρούσα περίπτωση, οδήγησε στην εκχύλιση των κύριων ενώσεων στο πειραματικό σημείο 0 min. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι το βήμα της φυγοκέντρησης κρίθηκε απαραίτητο για την επανάκτηση\επανασχηματισμό της μικροσταγόνας μετά τη γρήγορη ανάδευση του μίγματος επιμολυσμένης υδατικής φάσης και οργανικής φάσης. Στο διάγραμμα 1 φαίνεται η σημασία της ανάδευσης έναντι της φυγοκέντρησης καθώς επίσης ότι η μεταφορά μάζας αυξήθηκε σημαντικά από 0 έως 2 min 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.



Διάγραμμα 1: Η επίδραση του χρόνου ανάδευσης στην μικροεκχύλιση.

3. Επιλογή της ταχύτητας ανάδευσης

Το επόμενο βήμα ήταν η εξέταση της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης με το vortex από 0 έως 2500 rpm στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Προκειμένου αυτού, 50 μL 1-οκτανόλης εισαχθήκανε σε υδατικό διάλυμα επιμολυσμένο με 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ σε OP και BPA και 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ σε NP. Μετά την ανάδευση του μίγματος για 2 min με τη βοήθεια vortex και φυγοκέντρωση (2 min, 3500 rpm), 30 μL από την οκτανολική φάση συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση στην HPLC. Πάλι, το πειραματικό σημείο 0 rpm ανταποκρίνεται σε εκχύλιση χωρίς ανάδευση. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 2, αυξάνοντας την ταχύτητα από 0 έως 1500 rpm παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση στην απόκριση του μηχανήματος. Περαιτέρω αύξηση δεν είχε σημαντική επίδραση στην εκχύλιση. Βασισμένοι πάνω σε αυτές τις παρατηρήσεις αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί η μέγιστη ταχύτητα του vortex (2500 rpm).



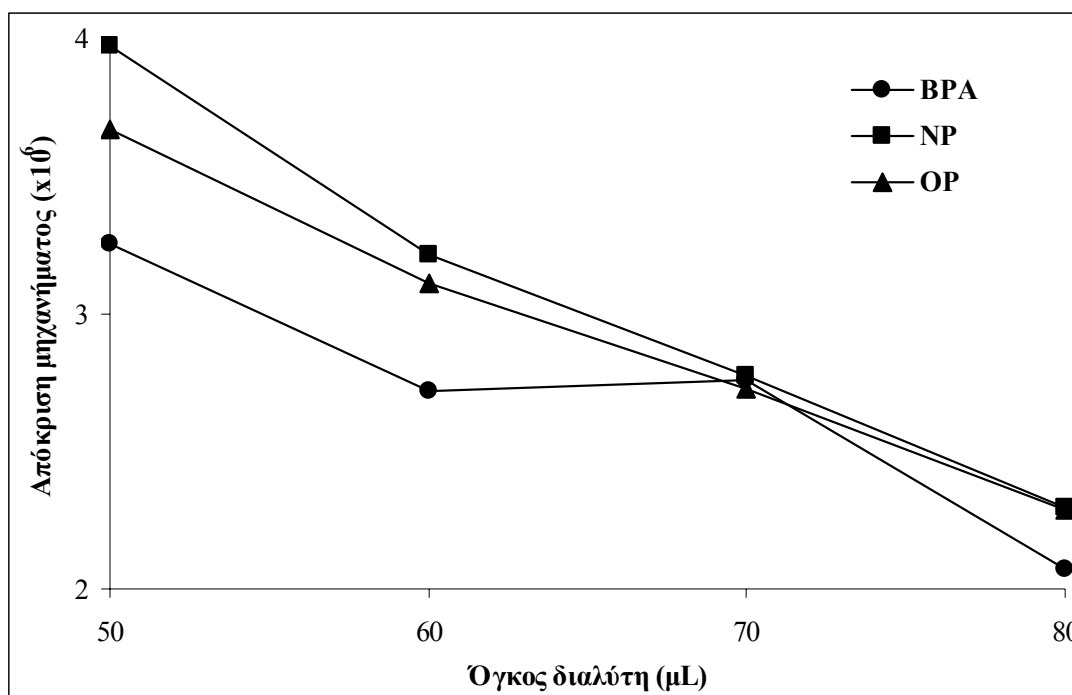
Διάγραμμα 2: Η επίδραση της ταχύτητας του vortex στη μικροεκχύλιση.

Η χρήση του αναδευτήρα vortex προκαλεί στροβιλισμό του μίγματος των δύο φάσεων μέσω μιας δίνης το μέγεθος και το σχήμα της οποίας εξαρτάται από την ταχύτητα περιστροφής του αναδευτήρα. Σε μεγάλες ταχύτητες περιστροφής σπάει η σταγόνα σε μικρότερα σταγονίδια μέσα στην υδατική φάση. Και αυτό ευνοεί τις

μικροεκχylίσεις γιατί είναι μέθοδοι αποκατάστασης ισορροπίας και λιγότερο μεταφοράς μάζας. Τα μικρά σταγονίδια οδηγούν τις κύριες ενώσεις προς την ισορροπία γρηγορότερα λόγω της μικρότερης απόστασης διάχυσης και της μεγαλύτερης ειδικής επιφάνειας και σε αυτή την περίπτωση η μοριακή διάχυση θεωρείται κυρίαρχη ^[29].

4. Επιλογή του όγκου του οργανικού διαλύτη

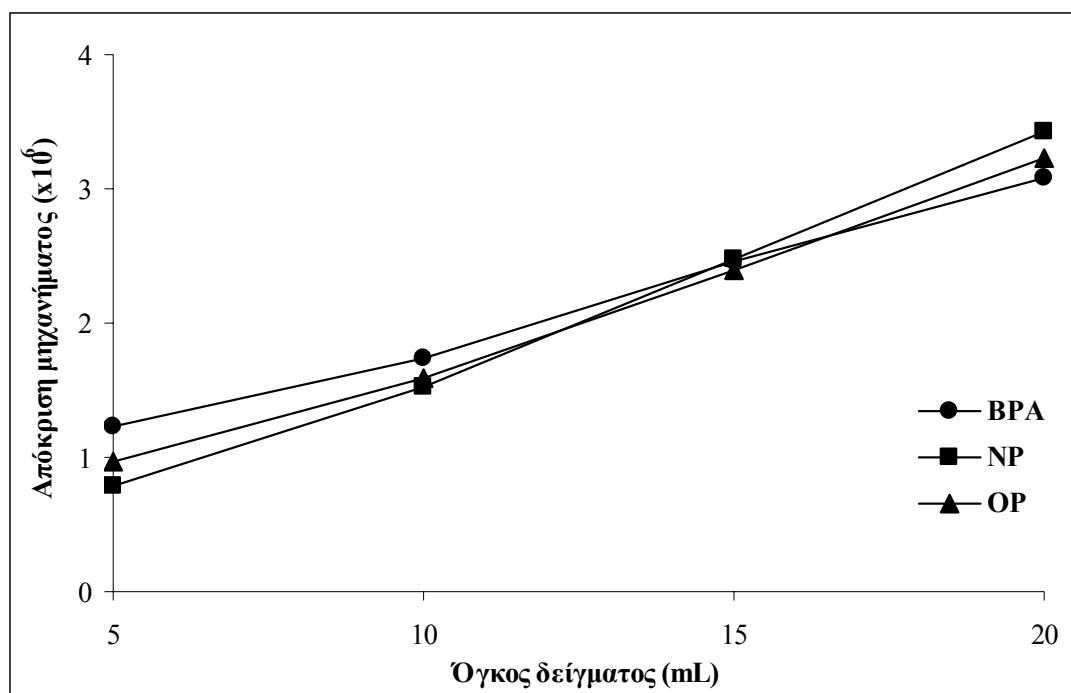
Σε χωριστή σειρά πειραμάτων, εξετάστηκε η επίδραση του όγκου της φάσης δέκτη στην FDME (διάγραμμα 3). Για το σκοπό αυτών των πειραμάτων όγκοι 1-οκτανόλης που κυμαίνονταν από 50-80 μL εισαχθήκανε σε 20 mL υδατικού διαλύματος επιμολυσμένου με $1 \mu\text{g l}^{-1}$ σε OP και BPA και $10 \mu\text{g l}^{-1}$ σε NP. Μετά την ανάδευση του μίγματος με τη βοήθεια vortex (2 min, 2500 rpm) και φυγοκέντρωση (2 min, 3500 rpm), 30 μL από την οκτανολική φάση συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση στην HPLC. Αποφεύχθηκαν οι μικρότεροι όγκοι της οργανικής φάσης λόγω της αδυναμίας συλλογής των 30 μL εξαιτίας της μερικής διάλυσης της οκτανόλης στην υδατική φάση. Τα αποτελέσματα του διαγράμματος 3, φανερώνουν ότι με την αύξηση του όγκου της μικροσταγόνας περιορίζεται η έκταση της εκχύλισης για όλες τις κύριες ενώσεις. Πράγματι, με την αύξηση του όγκου της φάσης δέκτη αναμένεται μείωση των συγκεντρώσεων των κύριων ενώσεων στην οκτανολική φάση ^[28, 44]. Επομένως, 50 μL ήταν ο βέλτιστος όγκος του οργανικού διαλύτη.



Διάγραμμα 3: Η επίδραση του όγκου του οργανικού διαλύτη (φάση δέκτης) στην μικροεκχύλιση με ελεύθερη σταγόνα.

5. Επιλογή του όγκου του υδατικού διαλύματος

Περαιτέρω, μελετήθηκε η επίδραση του όγκου του υδατικού διαλύματος στην FDME. Όγκοι υδατικού διαλύματος οι οποίοι κυμαίνονταν από 5 έως 20 mL επιμολυσμένων με $1 \mu\text{g l}^{-1}$ σε OP και BPA και $10 \mu\text{g l}^{-1}$ σε NP, εκχυλίστηκαν από 50 μL 1-οκτανόλης με ανάδευση του μίγματος με τη βοήθεια vortex (2 min, 2500 rpm) και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν (2 min, 3500 rpm). Όπως αναμενόταν (διάγραμμα 4), αυξάνοντας τον όγκο του επιμολυσμένου υδατικού διαλύματος αυξάνεται εμφανώς η συνολική ποσότητα των κύριων ουσιών που εκχυλίζονται αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο και την προσυγκέντρωση ^[45]. Ο όγκος των 20 mL υδατικού διαλύματος επιλέχθηκε για τα υπόλοιπα πειράματα.

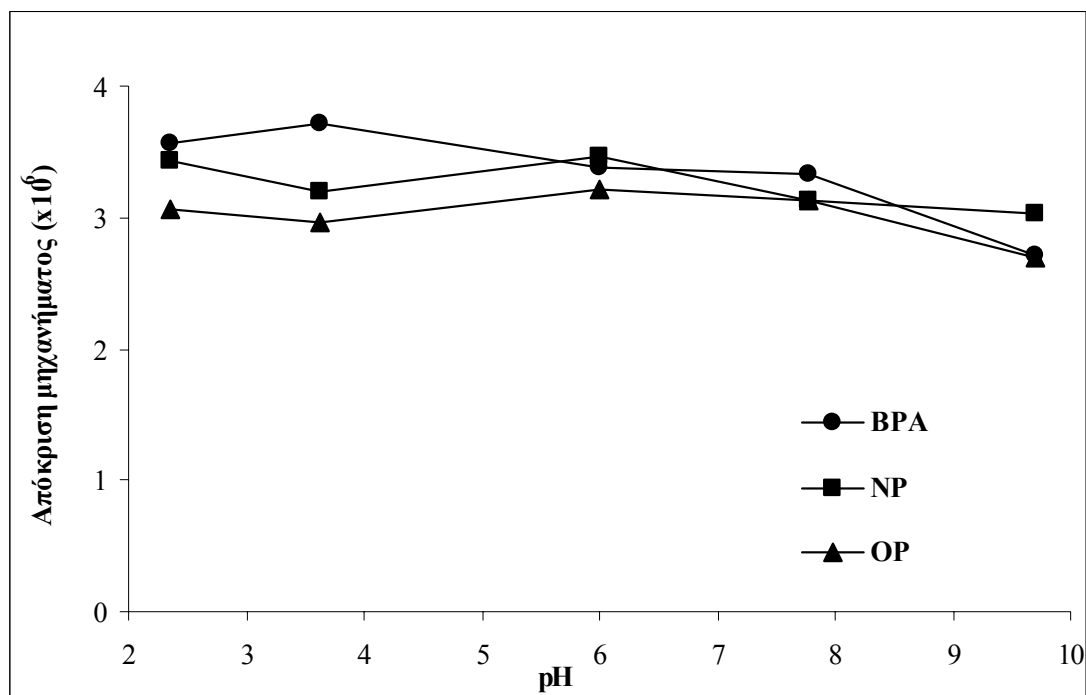


Διάγραμμα 4: Η επίδραση του όγκου του υδατικού διαλύματος στην μικροεκχύλιση με ελεύθερη σταγόνα

6. Επίδραση του pH

Επιπλέον, εξετάστηκε η επίδραση του pH στην αποτελεσματικότητα της FDME. Σε δουλειά που εξέδωσε ο Liu et al. το 2006 ^[46], το pH παρατηρήθηκε να έχει σημαντική επίδραση στην κινητικές ρόφησης των 4-*tert*-OP και NP στην μεμβράνη της 1-οκτανόλης πάνω στην κοίλη ίνα, ενώ δεν παρατηρήθηκε να επηρεάζει την αποκατάσταση της ισορροπίας. Ακόμη, σε πρόσφατη έρευνα όπου διερευνήθηκε η ανάλυση των APs, χλωροφαινολών και της BPA χρησιμοποιώντας μικροεκχύλιση υγρής φάσης προστατευμένη από κοίλη ίνα σε σύζευξη με GC-MS με παραγωγοποίηση πριν την εισαγωγή στο σύστημα ανάλυσης ^[42], οι Basheer και Lee ανέφεραν πτώση στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των κύριων ουσιών κατά την αύξηση της τιμής του pH. Ομοίως, ο Braun et al ^[41] στην ερευνά του με αυτοματοποιημένη SPME μέθοδο συζευγμένη με GC-MS για την εκχύλιση των NP, BPA και της 17α-αιθθυλεστραδιόλης παρατήρησε μειωμένη απόδοση της εκχύλισης με την αύξηση της τιμής του pH. Κατά τη διάρκεια της παρούσας έρευνας για τιμές του pH που κυμάνθηκαν από 2 έως 8 δεν παρατηρήθηκε σημαντική αρνητική

επίδραση στην εκχύλιση των κύριων ενώσεων (διάγραμμα 5). Επομένως, αποφασίστηκε να μην γίνεται αλλαγή στο pH των υδατικών δειγμάτων.

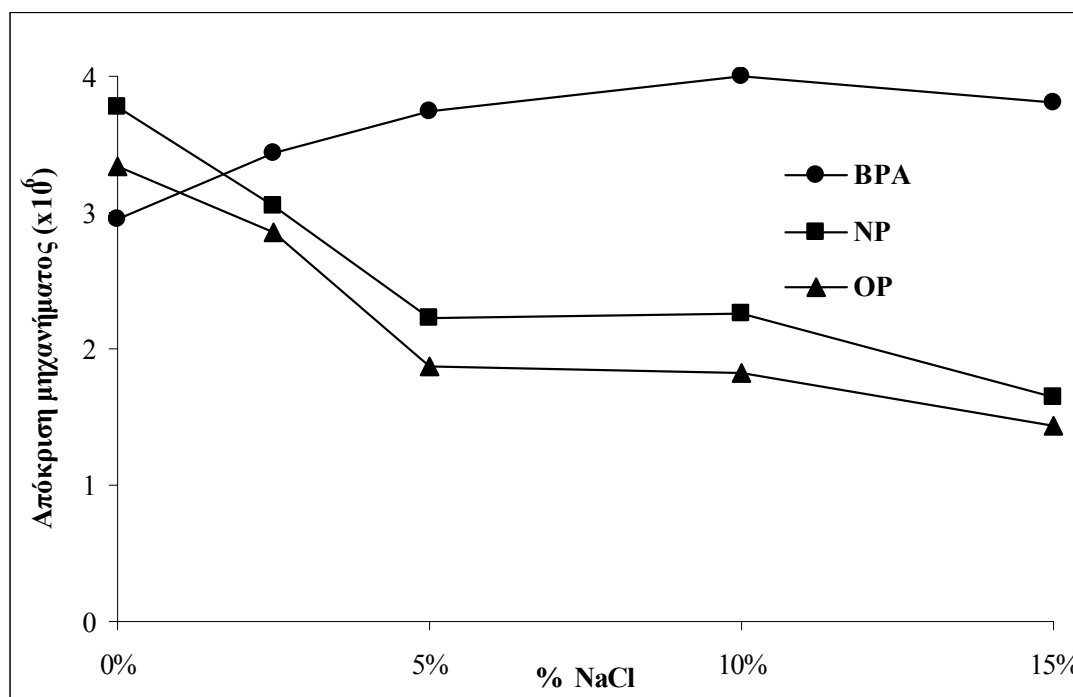


Διάγραμμα 5: Επίδραση της αλλαγής του pH στην μικροεκχύλιση.

7. Προσθήκη άλατος

Γενικά, ελάττωση της υδατοδιαλυτότητα των οργανικών ενώσεων, λόγω της παρουσίας διαλυμένου NaCl (salt – out effect), είναι αναμενόμενο να επηρεάσει θετικά την εκχύλιση αυτών των ενώσεων [28]. Η επίδραση του άλατος στην εκχύλιση μελετήθηκε και στην παρούσα εργασία σε χωριστή σειρά πειραμάτων, κατά την οποία 50 μL 1-οκτανόλης προστέθηκαν σε 20 mL υδατικού διαλύματος συγκεντρώσεων 0 έως 15 % NaCl και επιμολυσμένου με $1 \mu\text{g l}^{-1}$ σε OP και BPA και $10 \mu\text{g l}^{-1}$ σε NP. Το μίγμα στη συνέχεια αναδεύτηκε με τη βοήθεια vortex (2 min, 2500 rpm) και φυγοκεντρήθηκε (2 min, 3500 rpm). Τα αποτελέσματα τα οποία παρουσιάζονται και στο διάγραμμα 6 φανερώνουν ότι η παρουσία του άλατος δρα θετικά στην εκχύλιση της BPA, ενώ στην περίπτωση των NP και OP η παρουσία του άλατος περιορίζει την εκχύλισή τους. Παρόμοια παρατήρηση έγινε και από τον Braun et al [41] κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης της αυτοματοποιημένης SPME/GC-MS μεθόδου για την στοιχειακή ανάλυση των NP, BPA και της 17 α -αιθυνολεστραδιόλης καθώς με αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος το σήμα της NP

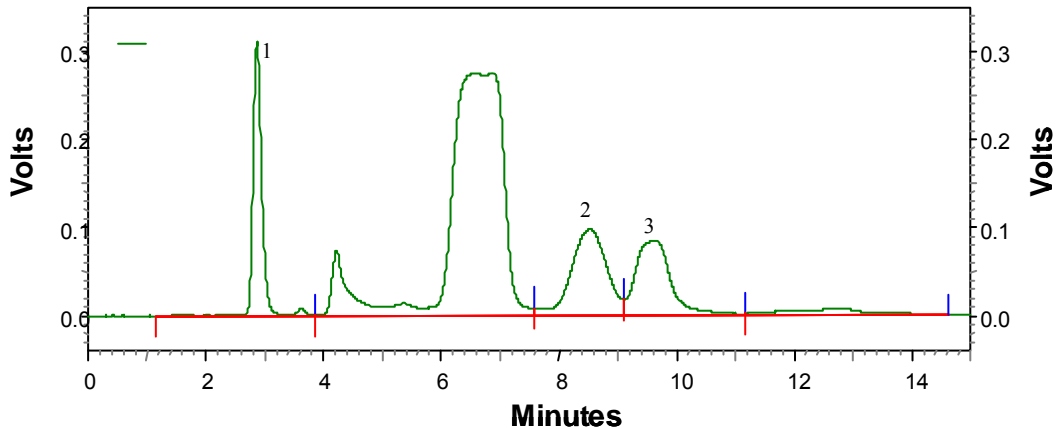
μειώθηκε σημαντικά ενώ το σήμα της BPA ελαφρώς αυξήθηκε. Λόγω αυτών των παρατηρήσεων αποφασίστηκε να μη γίνεται προσθήκη άλατος κατά τη διάρκεια της εκχύλισης.



Διάγραμμα 6: Η επίδραση της προσθήκης άλατος στην μικροεκχύλιση.

8. Χρήση των βέλτιστων συνθηκών

Στο διάγραμμα 7 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του ταυτόχρονου διαχωρισμού των τριών κύριων ενώσεων. Η πρώτη ένωση η οποία εκλύεται είναι η BPA (1) με χρόνο έκλυσης 2,9 min, δεύτερη η NP (2) στα 8,6 min και τελευταία είναι η OP (3) στα 9,6 min. Οι δύο κορυφές που παρεμβάλλονται μεταξύ της BPA και της NP αντιστοιχούν στην 1-οκτανόλη. Το χρωματογράφημα αυτό αντιπροσωπεύει τις βέλτιστες συνθήκες: 50 μL 1-οκτανόλης εισαχθήκανε σε 20 mL υδατικού διαλύματος επιμολυσμένου με $1 \mu\text{g l}^{-1}$ σε OP και BPA και $10 \mu\text{g l}^{-1}$ σε NP. Μετά την ανάδευση του μίγματος με τη βοήθεια vortex (2 min, 2500 rpm) και φυγοκέντρηση (2 min, 3500 rpm) για τον διαχωρισμό των δύο φάσεων, 30 μL από την οκτανολική φάση συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση στην HPLC.



Διάγραμμα 7: Χρωματογράφημα στον HPLC-FLD των BPA (1), NP (2) και OP (3)

Χρόνοι έκλουσης: (1): 2.9 min, (2): 8.6 min, (3): 9.6 min.

Η γραμμικότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τέσσερα επίπεδα συγκεντρώσεων που κυμαίνονταν από 0,05 έως 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ για την BPA και την OP και από 0,5 έως 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ για την NP, επιμολυσμένων διαλυμάτων απιονισμένου νερού. Η γραμμικότητα της μεθόδου κρίθηκε άριστη για κάθε ουσία με συντελεστές συσχέτισης $r_{\text{BPA}}^2 = 0.9934$, $r_{\text{OP}}^2 = 0.9997$ και $r_{\text{NP}}^2 = 0.9988$ ($n = 5$) και τα όρια ανίχνευσης κυμάνθηκαν στην περιοχή των χαμηλών επιπέδων σε $\mu\text{g l}^{-1}$. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου, εκφρασμένη σαν σχετική τυπική απόκλιση (RSD), ελέγχθηκε με την εκτέλεση πέντε αναλύσεων διαλύματος απιονισμένου νερού επιμολυσμένου με 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ σε BPA και OP και 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ σε NP και οι τιμές που πήρε ήταν 2,4, 2,1 και 2,2 % για την BPA, OP και NP αντιστοίχως ενώ για επιμόλυνση με 0,1 $\mu\text{g l}^{-1}$ σε BPA και OP και 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ σε NP οι τιμές που πήρε ήταν 5,9, 4,6 και 8,0 % για την BPA, OP και NP αντιστοίχως (πίνακας 1). Η ακρίβεια της FDME δια μέσου ημερών εκτιμήθηκε με διπλή ανάλυση υδατικού διαλύματος συγκεκριμένης συγκέντρωσης για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες. Η αναπαραγωγιμότητα της FDME σε τιμές RSD ήταν 5,5, 6,5 και 7,3 για τις BPA, OP και NP αντιστοίχως. Για όλα τα παραπάνω πειράματα 50 μL οκτανόλης-1 εισαχθήκανε σε 20 mL υδατικού διαλύματος. Μετά από ανάδευση με vortex για 2 min και σε 2500 rpm και φυγοκέντρωση για 2 min σε 3500 rpm για το διαχωρισμό των δύο φάσεων 30 μL της οργανικής φάση συλλέχθηκαν και εισαχθήκανε στην HPLC για ανάλυση.

Τα όρια ανίχνευσης (LOD) των κύριων ενώσεων υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τις καμπύλες βαθμονόμησης και το κριτήριο Long και Winefordner^[47] και βρέθηκαν στην περιοχή των χαμηλών επιπέδων σε $\mu\text{g l}^{-1}$ (0,03, 0,02 και 0,13

μg l⁻¹ για την BPA, OP και NP αντιστοίχως). Ο Liu et al. ^[34] ανέφερε τιμές για LOD του μεγέθους των 0,3 μg l⁻¹ για την NP και 0,7 μg l⁻¹ για την 4-*t*-OP χρησιμοποιώντας PL-LPME συζευγμένη με HPLC-FLD. Η ίδια ομάδα ^[46] ανέπτυξε μία μέθοδο βασισμένη στην αποκατάσταση ισορροπίας της 4-*t*-OP και της NP πάνω σε ένα λεπτό υμένιο από 1-οκτανόλη στηριζόμενο σε μεμβράνη κοίλης ίνας δίνοντας 0,06 και 0,1 μg l⁻¹ τιμές για τα LOD των 4-*t*-OP και NP αντιστοίχως. Το 2002, μία ποιοτική μέθοδος που συνέδεε την SPME με την HPLC-FLD βρέθηκε κατάλληλη για την ανάλυση διαφόρων παραγώγων της δισφαινόλης και έδινε τιμές για LOD 0,9 μg l⁻¹ για την BPA ^[36]. Επιπλέον, ο Kataoka et al. ανέφερε μία καινούρια μέθοδο SPME σε σωλήνα συζευγμένη με HPLC και ανιχνευτή φωτοδιόδου δίνοντας τιμές για LOD του μεγέθους των 0,1, 0,8 και 0,6 μg l⁻¹ για τις BPA, OP και NP αντιστοίχως ^[48]. Σε άλλη αναφορά, ο Fan et al. ^[37] εισήγαγε ένα επικάλυμμα σιλκόνης διευθετημένων μεσοπόρων (αποκαλούμενο ordered mesoporous silica coated capillary) τροποποιημένου με οκταδέκυλ ομάδες μέσα στο τριχοειδές για την διεκπεραίωση SPME σε σωλήνα συζευγμένη με HPLC με UV και FLD ανιχνευτές και αναφέρθηκε τιμή 2,4 μg l⁻¹ LOD για την BPA. Τελικά, ο Wen et al. ^[35] χρησιμοποίησε πολυμερές μονολίθου σε σωλήνα από πολυαιθερική αιθερική κετόνη για SPME σε σωλήνα συζευγμένη με HPLC-FLD για την ανάλυση τεσσάρων ενδοκρινικών διαταρακτών δίνοντας 0,02 μg l⁻¹ LOD για την BPA.

Πίνακας 1: Γραμμικότητα, όρια ανίχνευσης και επαναληψιμότητα της μικροεκχύλισης με ελεύθερη σταγόνα.

| Ουσία | Εύρος συγκεντρώσεων | | Όρια ανίχνευσης |
|-------|-----------------------|----------------|-----------------------|
| | (μg l ⁻¹) | r ² | (μg l ⁻¹) |
| BPA | 0.05-1 | 0,9934 | 0,03 |
| OP | 0.05-1 | 0,9997 | 0,02 |
| NP | 0.5-10 | 0,9988 | 0,13 |

9. Εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών σε πραγματικά δείγματα

Η αποτελεσματικότητα των μεθόδων μικροεκχύλισης επηρεάζεται από τη σύνθεση της μήτρας του δείγματος. Συνεπώς, δείγματα από ποτάμι, νερό βρύσης και εκροή βιολογικού καθαρισμού αστικών λυμάτων επιμολύνθηκαν με 1 μg l⁻¹ με BPA και OP και με 1 μg l⁻¹ με NP και αναλύθηκαν υπό τις βέλτιστες συνθήκες της FDME.

Ο μέσος όρος των μετρήσεων ($n = 3$) για κάθε ένωση σε κάθε επιμολυσμένο δείγμα συγκρίθηκε ως προς το μέσο όρο των τιμών ($n = 3$) δείγματος υπερκάθαρου νερού της ίδιας επιμόλυνσης προκειμένου να υπολογιστεί η σχετική ανάκτηση για κάθε μήτρα. Το μη-επιμολυσμένο δείγμα εκροής έδωσε σήμα για τις κύριες ενώσεις και ο μέσος όρος των μετρήσεων για κάθε ένωση ($n = 3$) αφαιρέθηκε από το σήμα της επιμολυσμένης μήτρας και η διαφορά τους συγκρίθηκε με το μέσο όρο των μετρήσεων επιμολυσμένου υπερκάθαρου νερού. Όπως φαίνεται (πίνακας 2), η αποτελεσματικότητα της προτεινόμενης μεθόδου προκειμένου για τα δείγματα ποταμού και νερού βρύσης κρίθηκε ικανοποιητική, επομένως η βαθμονόμηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση εξωτερικού προτύπου. Ωστόσο, στην περίπτωση των δειγμάτων εκροής παρατηρήθηκε μείωση στην εκχυλιζόμενη ποσότητα και άρα της ευαισθησίας στην περίπτωση της BPA. Συνεπώς, για την ποσοτικοποίηση σε πολύπλοκα περιβαλλοντικά δείγματα πρέπει να εφαρμοστεί η μέθοδος της προσθήκης προτύπων. Σε αυτή τη διαπίστωση κατέληξε και ο Braun et al. ^[41] χρησιμοποιώντας SPME συζευγμένη με GC-MS για την ανάλυση των NP, BPA και της 17α-αιθθυλεστραδιόλης.

Πίνακας 2: Σχετική ανάκτηση των BPA, NP και OP από φυσικά νερά δείγματα.

| Ουσία | Σχετική ανάκτηση (%) και RSD τιμές (%) ^{a, b} | | |
|-------|--|--------------|------------------|
| | Νερό βρύσης | Νερό ποταμού | Εκροή βιολογικού |
| BPA | 94 (3) | 105 (3) | 75 (2) |
| OP | 101 (3) | 111 (3) | 63 (6) |
| NP | 104 (4) | 109 (4) | 67 (7) |

^a επίπεδο επιμόλυνσης: 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ σε BPA και OP και 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ σε NP

^b μέσος όρος των 3 πειραμάτων.

Η προτεινόμενη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για τον προσδιορισμό των ενώσεων BPA, OP και NP σε επεξεργασμένα λύματα από τις Μονάδες Επεξεργασίας Αστικών Λυμάτων των πόλεων των Χανίων και του Ρεθύμνου της Κρήτης με τη χρήση της προσθήκης προτύπων. Πρώτα, ελέγχθηκε η γραμμικότητα της μεθόδου στη μήτρα των λυμάτων χρησιμοποιώντας τρία επίπεδα συγκεντρώσεων που κυμαίνονταν από 0,1 έως 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ για την BPA και την OP και από 1 έως 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ για την NP. Η γραμμικότητα της μεθόδου κρίθηκε ικανοποιητική για κάθε ουσία με συντελεστές συσχέτισης $r_{\text{BPA}}^2 = 0.9983$, $r_{\text{OP}}^2 = 0.9815$ και $r_{\text{NP}}^2 = 0.9417$.

Τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των κύριων ενώσεων στα δείγματα των παραπάνω μονάδων παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Συγκεντρώσεις των κύριων ενώσεων σε δείγματα εκροής από τις Μονάδες Επεξεργασίας Αστικών Αποβλήτων των πόλεων Χανιά και Ρέθυμνο – Κρήτης.

| Ουσία | Εκροή Χανίων ($\mu\text{g l}^{-1}$) | | | Εκροή Ρεθύμνου ($\mu\text{g l}^{-1}$) | | |
|-------|--|----------|----------|--|----------|------------|
| | 20/7/2007 | 3/8/2007 | 18/10/07 | 12/6/2007 | 6/8/2007 | 22/10/2007 |
| | BPA | 0,59 | 0,14 | $\Delta\text{A}^{\text{a}}$ | 0,56 | 0,28 |
| OP | 0,46 | 0,39 | 1,78 | 0,36 | 0,21 | 0,22 |
| NP | 7,02 | 3,2 | 14,5 | $\Delta\text{A}^{\text{a}}$ | 0,67 | 0,35 |

^a ΔA = Δεν Ανιχνεύτηκε

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, ο Liu et al. ^[34] ανέφερε ότι κατά την ανάλυση δειγμάτων εκροής από μονάδα επεξεργασίας λυμάτων οι συγκεντρώσεις των NP και 4-*t*-OP ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου IL-LPME συζευγμένη με HPLC-FLD (LOD: 0,3 $\mu\text{g l}^{-1}$ για την NP και 0,7 $\mu\text{g l}^{-1}$ για την 4-*t*-OP). Ο Wen et al. ^[35] χρησιμοποιώντας πολυμερές μονολίθου σε σωλήνα από πολυαιθερική αιθερική κετόνη για SPME σε σωλήνα συζευγμένη με HPLC-FLD για την ανάλυση τεσσάρων ενδοκρινικών διαταρακτών δίνοντας ανίχνευσε την BPA σε δείγματα από εκροή στη συγκέντρωση των 0,54 $\mu\text{g l}^{-1}$. Στην εργασία των Weltin et al. ^[49], κατά την ανάλυση δειγμάτων εκροής με GC-MS, η συγκέντρωση της BPA εκροής κυμάνθηκε από 0,03 έως 2,52 $\mu\text{g l}^{-1}$ με μέση τιμή την 0,49 $\mu\text{g l}^{-1}$. Σχετικά με την NP ο Keller et al. ^[50] ανίχνευσε συγκεντρώσεις μέχρι και 23 $\mu\text{g l}^{-1}$ κατά την ανάλυση δειγμάτων εκροής από την Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων του Βορειοανατολικού Κάνσας, ΗΠΑ.

Συμπεράσματα

Η προτεινόμενη μέθοδος Μικροεκχύλισης με Ελεύθερη Σταγόνα συντελεί στην ανάπτυξη μεθόδων άμεσης προετοιμασίας δείγματος οι οποίες να είναι απλές, οικονομικές και μπορούν να πραγματοποιηθούν σε κλίμακα μικροποσοτήτων. Ο συνολικός χρόνος προετοιμασίας δείγματος είναι ελαχιστοποιημένος (αυξάνοντας τον αριθμό των αναλύσεων) χωρίς να επιβαρύνεται και η ευαισθησία της μεθόδου. Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους μικροεκχύλισης η προτεινόμενη μέθοδος έχει το πλεονέκτημα της αποκατάστασης της ισορροπίας σε σύντομο χρονικό διάστημα, μειώνοντας ταυτόχρονα και σφάλματα που μπορεί να προκύψουν κατά τη διάρκεια της ανάλυσης.

Η FDME είναι μία οικονομική και πολλά υποσχόμενη μέθοδος παρασκευής δείγματος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση ιχνοποσοτήτων οργανικών ρυπαντών σε περιβαλλοντικά δείγματα.

Βιβλιογραφία

1. http://ec.europa.eu/environment/endocrine/definitions/endodis_en.htm
2. L. Keith, 1998. Environmental Endocrine Disruptors. Pure & Appl. Chem., 70, 2319-2326
3. http://ec.europa.eu/environment/endocrine/definitions/affect_en.htm
4. Danish Environmental Protection Agency, 1999. The Institute of Food Safety and Toxicology Danish Veterinary and Food Administration. Elsa Nielsen, Grete Østergaard, Inger Thorup, Ole Ladefoged, Ole and Jens Erik Jelnes. Toxicological Evaluation and Limit Values for Nonylphenol, Nonylphenol Ethoxylates, Tricresyl, Phosphates and Benzoic Acid. <http://www.mst.dk/udgiv/Publications/1999/87-7909-566-6/pdf/87-7909-565-8.PDF>.
5. M. Ahel, and W. Giger. 1993. Aqueous Solubility of Alkylphenols and Alkylphenol Polyethoxylates. Chemosphere 26:1461-1470.
6. U.S. EPA. 2005. Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria-Nonylphenol. Final. Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC. EPA-822-R-05-005. Available for download at: <http://www.epa.gov/waterscience/criteria/aqlife.html>.
7. A.C. Johnson, C. White, T.J. Besien, M.D. Jürgens, 1998. The Sorption Potential of Octylphenol, a Xenobiotic Oestrogen, to Suspended and Bed-Sediments Collected from Industrial and Rural Reaches of Three English Rivers. The Science of the Total Environ., 210/211, 271-282.
8. <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics1345.htm>.
9. <http://www.chemicalsland21.com/industrialchem/organic/4-OCTYLPHENOL.htm>.
10. <http://ptcl.chem.ox.ac.uk/MSDS/OC/4-octylphenol.html>.
11. <http://chemfinder.cambridgesoft.com/result.asp>.
12. M. Ahel, and W. Giger. 1993. Partitioning of Alkylphenols and Alkylphenol Ethoxylates between Water and Organic Solvents. Chemosphere 26:1471-1478.
13. C.A. Staples, P.B. Dorn, G.M. Klecka, S.T. O'Block, 1998. A Review of the Environmental Fate, Effects, and Exposures of Bisphenol-A. Chemosphere, 36, 2149-2173.
14. J.-H. Kang, Y. Katayama, F. Kondo, 2006. Biodegradation or Metabolism of Bisphenol-A: from Microorganisms to Mammals. Toxicology, 217, 81-90.
15. <http://www.ec.gc.ca/substances/ese/eng/psap/final/npe.cfm>
16. G.-G. Ying, B. Williams, R. Kookana, 2002. Environmental Fate of Alkylphenols and Alkylphenol Ethoxylates-a Review. Environ. Intern. 28, 215-226.
17. <http://www.aperc.org/productinfo.htm>
18. D.T. Bennie, C.A. Sullivan, H.-B. Lee, T.E. Peart, R.J. Maguire, 1997. Occurrence of Alkylphenols and Alkylphenol Mono- and DiEthoxylates in Natural Waters of Laurentian Great Lakes Basin and the Upper St. Laurence River. The Science of the Total Environ., 193, 263-275.
19. <http://website.lineone.net/~mwarhurst/bisphenol.html>
20. <http://www.bisphenol-a.org/about/index.html>
21. M.H.I. Comber, T.D. Williams, K.M. Stewart, 1993. The effects of Nonylphenol on *Daphnia Magna*. Wat. Res., 27, 273-276.

22. M.R. Servos, 1999. Review of the Aquatic Toxicity, Estrogenic Responses and Bioaccumulation of Alkylphenols and Alkylphenol Polyethoxylates. *Wat. Qual. Res. J. of Canada*, 34, 123-177.
23. G.-G. Ying, 2006. Fate, Behavior and Effects of Surfactants and their Degradation Products in the Environment. *Environ. Intern.*, 32, 417-431.
24. J.Pawlszyn, S. Pedersen-Bjergaard, 2006. Analytical Microextraction: Current Status and Future Trends. *J. Chromatogr. Sci.*, 44, 291-307.
25. C.L. Arthur, J. Pawliszyn, 1990. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.*, 62, 2145-2148.
26. H. Liu, P.K. Dasgupta, 1996. Analytical Chemistry in a Drop. Solvent Extraction in a Microdrop. *Anal. Chem.*, 68, 1817-1821.
27. M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, 1997. Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle. *Anal. Chem.*, 69, 235-239.
28. E. Psillakis, N. Kalogerakis, 2002. Developments in single-drop Microextraction. *Trends Anal. Chem.*, 21, 54-64.
29. L. Yangcheng, L. Quan, L. Guangsheng, D. Youyuan, 2006. Directly Suspended Droplet Microextraction. *Anal. Chim. Acta*, 566, 259-264.
30. H. Fang, Z. Zeng, L. Liu, 2006. Centrifuge Microextraction Coupled with On-Line Back-Extraction Field Amplified Sample Injection Method for the Determination of Trace Ephedrine Derivatives in the Urine and Serum. *Anal. Chem.*, 78, 6043-6049.
31. M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaei, F. Ahmadi, S. Berijani, 2006. Determination of Organic Compounds in Water Using Dispersive Liquid – Liquid Microextraction. *J. Chromatogr. A*, 1116, 1-9.
32. M.R.K. Zanjani, Y. Yamini, S. Shariati, J.A. Jonsson, 2007. A New Liquid – Phase Microextraction Method Based on Solidification of Floating Organic Drop. *Anal. Chim. Acta*, 585, 286-293.
33. A. Díaz, F. Ventura, M. Teresa Galceran, 2002. Development of a Solid-Phase Microextraction Method for the Determination of Short-Ethoxy-Chain Nonylphenols and their Brominated Analogs in Raw and Treated Water. *J. of Chrom. A.*, 963, 159-167.
34. J.-F. Liu, Y.-G. Chi, G.-B. Jiang, C. Tai, J.-F. Peng, J.-T. Hu, 2004. Ionic Liquid-Based Liquid-Phase Microextraction, a new Sample Enrichment Procedure for Liquid Chromatography. *J. of Chrom. A.*, 1026, 143-147.
35. Y. Wen, B.O.S. Zhou, Y. Xu, S.-W. Jin, Y.-Q. Feng, 2006. Analysis of Estrogens in Environmental Waters using Polymer Monolith In-Polyether ether Ketone Tube Solid-Phase Microextraction Combined with High-Performance Liquid Chromatography. *J. of Chrom. A.*, 1133, 21-28.
36. C. Nerín, M.R. Philo, J. Salafranca, L. Castle, 2002. Determination of Bisphenol-Type Contaminants from Food Packaging Materials in Aqueous Foods by Solid-Phase Microextraction-High Performance Liquid Chromatography. *J. of Chrom. A.*, 963, 375-380.
37. Y. Fan, Y.-Q. Feng, Z.-G. Shi, J.-B. Wang, 2005. Ordered Mesoporous Silica Coated Capillary for In-Tube Solid Phase Microextraction Coupled to High Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 543, 1-8.
38. A. Díaz, L. Vázquez, F. Ventura, M. Teresa Galceran, 2004. Estimation of Measurement Uncertainty for the Determination of Nonylphenol in Water using Solid-Phase Extraction and Solid-Phase Microextraction Procedures. *Anal. Chim. Acta*, 506, 71-80.

39. J. Salafranca, R. Batlle, C. Nerín, 1999. Use of solid-phase microextraction for the analysis of bisphenol A and bisphenol A diglycidyl ether in food simulants. *J. of Chrom. A.*, 864, 137-144.
40. L. Yang, T. Luan, C. Lan, 2006. Solid-phase microextraction with on-fiber silylation for simultaneous determinations of endocrine disrupting chemicals and steroid hormones by gas chromatography–mass spectrometry. *J. of Chrom. A.*, 1104, 23-32.
41. P. Braun, M. Moeder, St. Schrader, P. Popp, P. Kusch, W. Engewald, 2003. Trace analysis of technical nonylphenol, bisphenol A and 17 α -ethinylestradiol in wastewater using solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. of Chrom. A.*, 988, 41-51.
42. C. Basheer, H.K. Lee, 2004. Analysis of Endocrine Disrupting Alkylphenols, Chlorophenols and Bisphenol-A using Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction Coupled with Injection Port-Derivatization Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J of Chrom. A.*, 1057, 163-169.
43. M. Kawaguchi, R. Ito, N. Endo, N. Okanouchi, N. Sakui, K. Saito, H. Nakazawa, 2006. Liquid Phase Microextraction with In Situ Derivatization for Measurement of Bisphenol A in River Water Sample by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. of Chrom. A.*, 1110, 1-5.
44. J.-X. Wang, D.-Q. Jiang and X.-P. Yan, 2006. Determination of Substituted Benzenes in Water Samples by Fiber-In-Tube Liquid Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography. *Talanta*, 68, 3, 945-950.
45. L. Vidal, A. Canals, N. Kalogerakis and E. Psillakis, 2005. Headspace Single-Drop Microextraction for the Analysis of Chlorobenzenes in Water Samples. *J. Chromatogr. A.*, 1089, 25-30.
46. J.-F. Liu, X.-L. Hu, J.-F. Peng, J. A. Jonsson, P. Mayer, G.-B. Jiang, 2006. Equilibrium Sampling of Freely Dissolved Alkylphenols into a Thin Film of 1-Octanol Supported on a Hollow Fiber Membrane. *Anal. Chem.*, 78, 8526-8534.
47. G.L. Long, J.D. Winefordner, 1983. Limit of Detection. A Closer Look at IUPAC Definition. *Anal. Chem.*, 55, 712A-724A.
48. H. Kataoka, M. Ise and S. Narimatsu, 2002. Automated On-Line In-Tube Solid-Phase Microextraction coupled with High Performance Liquid Chromatography for the Analysis of Bisphenol A, Alkylphenols, and Phthalate Esters in Food Contacted with Plastics. *J. Sep. Sci.*, 25, 77-85.
49. D. Weltin, M. Gehring, L. Tennhardt, D. Vogel, B. Bilitewski, 2002. Occurrence and Fate of Bisphenol A during Wastewater and Sewage Sludge Treatment in Selected German Wastewater Treatment Plants. Proceedings of 2002 AWWA Endocrine Disruptors and the Water Industry Symposium, April 18-20, 2002, Cincinnati, Ohio, USA.
50. H. Keller, K. Xia, A. Bhandari, 2003. Occurrence and Degradation of Estrogenic Nonylphenol and its Precursors in Northeast Kansas Wastewater Treatment Plant. *Pract. Period. Haz., Toxic, Radioact. Waste Mgmt*, 7, 203-213.