



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ - ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Α. ΠΑΡΙΣΗΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΙΧΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ
ΜΕ ΜΕΘΟΔΟ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΜΕΣΩ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ
ΠΥΡΙΤΙΑΣ ΣΕ ΚΥΣΤΙΔΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ (ASPD)

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΣΤΙΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ
ΣΤΗΝ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ “ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ”

ΙΩΑΝΝΙΝΑ
ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2006

Το παρόν ΜΔΕ εκπονήθηκε στα πλαίσια του αναμορφωμένου ΠΜΣ του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, που χρηματοδοτείται από το ΕΠΕΑΕΚ II.



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΥΠΗΡΕΤΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΩΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ
ΣΤΗΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



ΠΑΙΔΕΙΑ ΜΠΡΟΣΤΑ
2^ο Επιχειρηματικό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης

ΣΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ. . .

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Κύριος στόχος της διατριβής αυτής ήταν η ανάπτυξη μιας μεθόδου ταυτοχρονης εκχύλισης υδρόφιλων και υδρόφιβων οργανικών ενώσεων από υδατικά διαλύματα. Αυτό έγινε εφικτό με τη χρήση κυστιδιακών συσσωμάτων επιφανειοδραστικών ενώσεων. Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις, βρισκόμενες υπό κατάλληλες συνθήκες, σχηματίζουν κυστίδια, μέσα στα οποία μπορούμε να παγιδεύσουμε τις προς εκχύλιση ουσίες μας. Τα κυστίδια αυτά, λόγω του θετικού τους φορτίου προσκολλούνται σε αρνητικά φορτισμένη πυριτία (silica) και απομονώνονται εύκολα, ενώ η παγιδευμένες σε αυτά ενώσεις εκχυλίζονται άμεσα σε αλκοόλη. Έτσι, διερευνήθηκε η δυνατότητα αναλυτικής εφαρμογής της παραπάνω τεχνικής ως μεθόδου ταυτόχρονης προσυγκέντρωσης υδρόφιλων και υδρόφιβων οργανικών ενώσεων, πριν τον προσδιορισμό τους με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

Η διατριβή εκπονήθηκε στο σύνολο της στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θα ήθελα σε αυτό το σημείο να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν στην πραγματοποίηση της διατριβής μου.

Ευχαριστώ τον επιβλέποντα καθηγητή μου Νικόλαο Ευμοιρίδη, καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την υπόδειξη του θέματος και την επίβλεψή του, και τους Επίκουρους Καθηγητές Αθανάσιο Βλεσσίδη και Παναγιώτη Βελτσίστα που, μαζί με τον Ν. Ευμοιρίδη αποτέλεσαν την τριμελή επιτροπή επίβλεψης και οι οποίοι με εύστοχες παρατηρήσεις συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της εργασίας μου.

Ευχαριστώ θερμά τον Δημοσθένη Γκιώκα, μεταδιδακτορικό ερευνητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την επίβλεψη και την καθοδήγηση του σε όλη τη διάρκεια της εργασίας μου, καθώς και της συγγραφής. Επίσης ευχαριστώ όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας, για τη συνεργασία τους και το ευχάριστο εργασιακό περιβάλλον.

Τέλος θα γίθελα να αφιερώσω το έργο αυτό στην οικογένεια μου για την υπομονή και τη συμπαράστασή της όλα αυτά τα χρόνια.

Ορολογία

Λόγω έλλειψης ελληνικής ορολογίας, σε κάποια σημεία του κείμενο της διατριβής θα χρησιμοποιούνται κάποιοι νεοεμφανιζόμενοι ελληνικοί όροι, ενώ σε κάποια άλλα θα χρησιμοποιούνται για λόγους ευχολίας οι αντίστοιχοι αγγλικοί. Η ερμηνεία των όρων αυτών είναι η ακόλουθη:

Διαλυτότητα Προσρόφησης (Adsolubilization) - Το φαινόμενο της “διαλυτοποίησης” επιφανειοδραστικών ενώσεων πάνω στην επιφάνεια φορτισμένου σωματιδίου.

Διαλύτης Προσρόφησης (Adsolubilizate) - Το φορτισμένο σωματίδιο πάνω στο οποίο λαμβάνει χώρα η “διαλυτοποίηση” των επιφανειοδραστικών ενώσεων.

Μυκίλαιο Προσρόφησης (Admicell) - Το μυκίλαιο που σχηματίζεται με την προσρόφηση επιφανειοδραστικών μορίων στην επιφάνεια ενός φορτισμένου σωματιδίου.

Κυστίδιο Προσρόφησης (Advesicle) - Το κυστίδιο που σχηματίζεται με την προσρόφηση διπλοστοιβάδων επιφανειοδραστικών μορίων στην επιφάνεια ενός φορτισμένου σωματιδίου.

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΟΡΟΛΟΓΙΑ	3
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
I ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ	15
2.1 Εισαγωγή	15
2.2 Μεθοδολογία	15
2.3 Εφαρμογή SPE σε πολυσυστατικά υδατικά δείγματα	17
3 ΚΥΣΤΙΔΙΑ	19
3.1 Εισαγωγή	19
3.2 Διεργασίες Σχηματισμού	24
3.2.1 Σχηματισμός με Χρήση Εξωτερικής Ενέργειας (Υπέρηχοι ή Ανάδευση)	25
3.2.2 Αυθόρυμητος Σχηματισμός	25
3.2.3 Άλλες Τεχνικές Σχηματισμού	26
3.3 DDAB	27
4 ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ	29
4.1 Χημεία Επιφάνειας της Πυριτίας	29
4.2 Ισόθερμοι Προσρόφησης	30
4.2.1 Εισαγωγή	30

4.2.2 Ανάλυση των Ισοθέρμων Προσρόφησης	32
4.2.3 Μοντέλο “Δύο Σταδίων”	32
4.2.4 Μοντέλο “Τεσσάρων Περιοχών”	34
5 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	39
5.1 Εισαγωγή	39
5.1.1 Ταξινόμηση χρωματογραφικών μεθόδων	40
5.1.2 Αέριος χρωματογραφία	41
5.1.3 Χρωματογραφία αέριου-στερεού	42
5.1.4 Χρωματογραφία αερίου-υγρού	42
5.2 Υγρή Χρωματογραφία	42
5.2.1 Διάφορες Υγρές Χρωματογραφικές μέθοδοι	45
5.2.2 Βασικές Παράμετροι της Υγρής Χρωματογραφίας	49
II ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	55
6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ	57
6.1 Αντιδραστήρια	57
6.2 Όργανα	59
6.3 Διασπορά στερεής φάσης κυστιδίων προσρόφησης (ASPD)	59
6.4 Εκχύλιση στερεής φάσης κυστιδίων προσρόφησης (ASPE)	60
7 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	63
7.1 Προσρόφηση επιφανειοδραστικού στη πυριτία	63
7.2 Μελέτη Παραμέτρων	65
7.2.1 Επίδραση της ανάδευσης στο σχηματισμό κυστιδίων και τη “διαλυτότητα προσρόφησης”	67
7.2.2 Επίδραση της συγκέντρωσης DDAB	68
7.2.3 Επίδραση της ποσότητας προσροφητικού και της επεξεργασίας του. .	69
7.2.4 Επίδραση pH και ρυθμιστικού διαλύματος	71
7.2.5 Επίδραση των ανόργανων ηλεκτρολυτών	72
7.2.6 Επίδραση επιφανειοδραστικών μονής αλυσίδας	75

7.2.7	Επίδραση της θερμοκρασίας	76
7.2.8	Επίδραση εκλουστικού μέσου	77
7.3	Σύγκριση διάχυσης στερεάς φάσης (SPD) με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)	77
7.4	'Ογκος διαφυγής (Breakthrough volume)	78
7.5	Αναγέννηση προσροφητικού μέσου	78
7.6	Αναλυτική αξία της μεθόδου - Εφαρμογές	79
8	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	83
	SUMMARY	85
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	96
	ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	99
	ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	101

Κεφάλαιο 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες, η εφαρμογή επιφανειοδραστικών ενώσεων εξελίσσεται με ταχύ ρυθμό στο πεδίο των διαχωρισμών. Μια σχετικά νέα και ελάχιστα μελετημένη περιοχή των αναλυτικών αυτών εφαρμογών είναι η ιδιότητά των επιφανειοδραστικών μορίων να προσκολλούνται σε επιφάνειες στερεών με έναν δισδιάστατο προσανατολισμό προκαλώντας έτσι ένα φαινόμενο που καλείται “διαλυτότητα προσρόφησης” (adsolubilization) [1]. Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται στη συνάθροιση μυκιλλιών των ιοντικών επιφανειοδραστικών μορίων σε αντίθετα φορτισμένες επιφάνειες, συνήθως ανόργανων οξειδίων όπως αλουμίνια, πυριτία, διοξείδιο του τιτανίου, κτλ. Το φαινόμενο εξαρτάται από την υδροφοβικότητα των “διαλυτών προσρόφησης” (adsolubilizates) καθώς επίσης και το μικροπεριβάλλον των προσροφημένων στρωμάτων των επιφανειοδραστικών και περιγράφεται με ένα φαινόμενο προσρόφησης τεσσάρων περιοχών (όταν παρουσιάζεται σε διάγραμμα με διπλή λογαριθμική κλίμακα), η οποία καθορίζει τον τύπο και τη μορφή των συσσωμάτων στην επιφάνεια. Επομένως είναι κατανοητό ότι απαιτείται να ξεπεραστεί μια κρίσιμη συγκέντρωση για να επιτραπέται στα συσσωμάτων επιφανειοδραστικών να προσροφηθούν σε μια δεδομένη επιφάνεια, αλλά ο τύπος των συσσωματωμάτων που διαμορφώνονται υπόκειται ακόμα σε αντιπαράθεση [2].

Συγκρινόμενη με άλλα μυκιλλιακά συστήματα, η “διαλυτότητα προσρόφησης” προσφέρει αρκετά αναλυτικά πλεονεκτήματα. Αρχικά, παρέχει περισσότερο υδροφοβικό περιβάλλον από τα συμβατικά μυκιλλιακά συστήματα, το οποίο προσεγγίζει τις ιδιότητες της 1-οκτανόλης ή του οξεικού αιθυλεστέρα [3]. Συγχρόνως, η συμπροσρόφηση των ασθενών οξέων ή βάσεων, είναι δύο έως τρεις φορές μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες σταθερές διαλυτοποίησης των μικυλλών, επιτρέποντας τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των φορτισμένων ενώσεων [4]. Επιπλέον, η γενική διεργασία δεν καθορίζεται μόνο από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιφανειοδραστικών ενώσεων στο διάλυμα, αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιφανειοδραστικών ενώσεων με τις φορτισμένες επιφάνειες, στις οποίες τελικά αποδίδεται

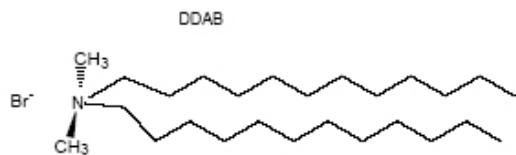
η τελική δομή των συσσωματωμάτων στη στερεά επιφάνεια. Κατά συνέπεια, ανάλογα με την συγκέντρωση, μπορούν να σχηματιστούν “μυκίλια προσρόφησης” (admicelles), παρέχοντας διαφορετικές ιδιότητες διαλυτοποίησης σε διάφορες οργανικές διαλυμένες ουσίες διαφορετικής πολικότητας [5]. Όλα αυτά συνηγορούν στο επίτευγμα υψηλών παραγόντων προσυγκέντρωσης, οι οποίοι ανταγωνίζονται αυτούς της εκχύλισης στερεής φάσης (SPE), ειδικά σε περιπτώσεις πολύ χαμηλών συγκέντρωσεων αναλυτών. Οι περιορισμοί των μεθόδων αυτών βρίσκονται στην αποδόμηση των “μυκιλίων προσρόφησης” (admicelles), με αποτέλεσμα τη μειώση της ικανότητας της εκχύλισης και τη χαμηλή απόδοση σε ανόργανους ηλεκτρολύτες λόγω του ανταγωνισμού τους με το επιφανειοδραστικό για τις προσροφητικές περιοχές της επιφάνειας του στερεού, περιορίζοντας έτσι την εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα με χαμηλή περιεκτικότητα αλάτων (< 0,2 M) [6, 7].

Αν και πολλές μελέτες έχουν δημοσιευτεί πάνω στην προσρόφηση κατιοντικών επιφανειοδραστικών σε διάφορες επιφάνειες, ελάχιστες προηγούμενες μελέτες που να περιγράφουν ένα τέτοιο σύστημα για αναλυτικούς σκοπούς έχουν παρουσιαστεί. Επιπλέον, όλες οι αναλυτικές μέθοδοι που δημοσιεύονται έως τώρα στρέφονται στο σχηματισμό των μικυλλιακών δομών, παραβλέποντας την δυνατότητα των κυστίδων να προσροφούνται στα ανόργανα οξείδια. Κατά συνέπεια, η ακινητοποίηση ιοντικών κυστίδιακών συσσωμάτων επιφανειοδραστικών ενώσεων σε επιφάνειες είναι ένας ανεξερεύνητος τομέας. Όμως, αντίθετα από τις μυκιλλιακές συστάδες, όπου πρέπει να επιτευχθεί μια κρίσιμη συγκέντρωση, τα κυστίδια εξασφαλίζουν εγγενώς το διαχωρισμό πολικών και μη πολικών αναλύτων λόγω της ειδικής δομής τους, αφού αποτελούνται από μια ή περισσότερες διπλοστοιβάδες, διευθετημένες σε μια κοίλη, κλειστή γεωμετρία, όπου μπορούν και εγκλωβίζουν μέσα τους και υδρόφιλους και υδρόφοβους αναλύτες [7, 8].

Βασικό σημείο στην αναλυτική εφαρμογή των κυστίδων είναι η προετοιμασία τους, λόγω του ότι οι επιφανειοδραστικές ενώσεις με ιδιότητα να σχηματίζουν κυστίδια είναι περιορισμένες ή εμπορικά μη διαθέσιμες. Επιπλέον, η προετοιμασία των κυστίδων από μίγματα ανιοντικών-κατιοντικών επιφανειοδραστικών (κατανιοντικά κυστίδια - catanionic vesicles) με χρήση συν-επιφανειοδραστικών, είναι συνήθως χρονοβόρα και απαιτεί μεγάλη ακρίβεια και αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, αφού μικρές αποκλίσεις μπορούν να προκαλέσουν τελείως διαφορετικές μορφολογικά δομές [9, 10]. Επιπλέον, όλες οι μέχρι τώρα δημοσιευμένες μέθοδοι που αφορούν τη χρήση κυστίδων εξετάζουν την εφαρμογή τους σε διαδικασίες υγρής-υγρής εκχύλισης και οι μόνες γνωστές εφαρμογές χημικά υποστηριγμένων κυστίδων είναι η χρησιμοποίησή τους ως τροποποιητές στάσιμης φάσης στην υγρή χρωματογραφία και την ηλεκτροφόρηση [11, 12].

Τα συμμετρικά άλατα των τεταρτοταγών αμμωνιακών επιφανειοδραστικών ενώσεων είναι τα πιο κοινά αμφίφιλα διπλής αλυσίδας, από τα οποία το βρωμιούχο διδωδέκυλ-διμεθυλ-αμμώνιο (didodecyldimethylammonium bromide - DDAB) είναι ίσως το πιο συχνά μελετημένο. Παρακινούμενοι από το γεγονός ότι το DDAB σχηματίζει αυθόρυμητα κυστοειδείς δομές σε υδατικά διαλύματα [13], ερευνήσαμε τη δυνατότητα των κατιοντικών κυστίδων να προσροφούνται στην αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια

της πυριτίας (silica) και να αλληλεπιδρούν με τις οργανικές ενώσεις του διαλύματος. Έτσι, υπολείμματα προϊόντων προσωπικής φροντίδας (αντηλιακά) εκχυλίστηκαν από νερό πισίνας υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες. Τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και ανίχνευση υπεριώδους απορρόφησης (UV), αποκαλύπτοντας ότι η προτεινόμενη μεθοδολογία προσφέρει υψηλούς παράγοντες ανάκτησης και προσυγκέντρωσης. Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που αναφέρεται στην αναλυτική χρησιμότητα των υποστηριγμένων κυστιδιακών συσωματωμάτων ως νέα εναλλακτική λύση για προσυγκέντρωση οργανικών αμφίφιλων από υδατικά διαλύματα.



Σχήμα 1.1. Το μόριο του DDAB.

Μέρος Ι

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 2

ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (Solid Phase Extraction - SPE)

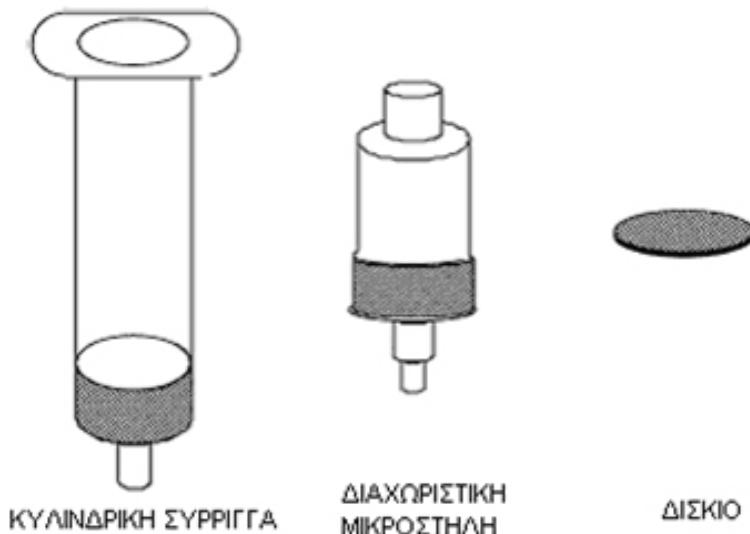
2.1 Εισαγωγή

Παρά την εκλεκτικότητα και την ευαισθησία των αναλυτικών τεχνικών, όπως η υγρή χρωματογραφία, υπάρχει ανάγκη για προσυγκέντρωση των ενώσεων πριν από την ανάλυσή τους, λόγω των συχνά χαμηλών συγκεντρώσεών τους σε πολλά δείγματα (κυρίως υδατικά). Η υγρή-υγρή εκχύλιση είναι μια κλασική μέθοδος για την εκχύλιση οργανικών ενώσεων από τα υδατικά διαλύματα. Η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) είναι μια άλλη προσέγγιση που προσφέρει πολλά και σημαντικά οφέλη: μειώνει τη χρήση διαλυτών και την έκθεση σε αυτούς, το οικονομικό κόστος της ανάλυσης, καθώς και το χρόνο προετοιμασίας της εκχύλισης των δειγμάτων. Συνεπώς, τα τελευταία χρόνια η SPE έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για το διαχωρισμό, κυρίως από υδατικά διαλύματα, και την προσυγκέντρωση οργανικών ενώσεων πριν από το χρωματογραφικό προσδιορισμό τους. [14]

2.2 Μεθοδολογία

Στην εκχύλιση στερεής φάσης (SPE) ένα υδατικό διάλυμα (δείγμα) έρχεται σε επαφή μια στερεή φάση (προσροφητικό υλικό). Η τεχνική αυτή συμπεριλαμβάνει τον καθαρισμό και την προσυγκέντρωση του αναλύτη από ένα διάλυμα με προσρόφηση σε ένα στερεό. Το υγρό

δείγμα διέρχεται από μια στήλη, μια μικροστήλη (cartridge) ή ένα δισκίο, τα οποία περιέχουν το προσροφητικό υλικό που συγκρατεί τον αναλύτη (σχήμα 2.1). Στη συνέχεια ο αναλύτης εκλούεται από το προσροφητικό υλικό με τον κατάλληλο διαλύτη.

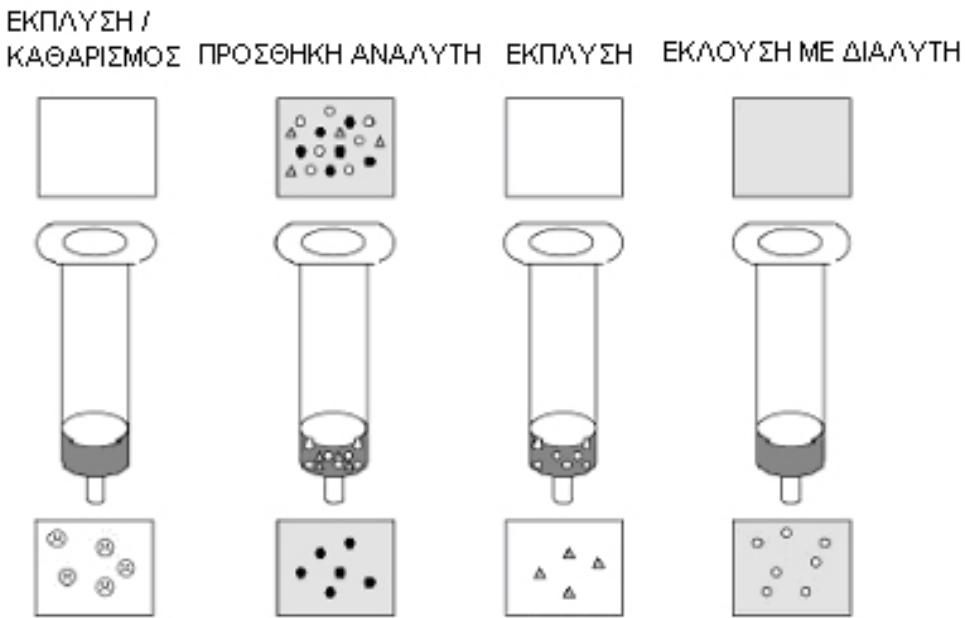


Σχήμα 2.1. Εξαρτήματα για SPE.

Η διαδικασία εκχύλισης στερεής φάσης περιλαμβάνει συνήθως τέσσερα στάδια (σχήμα 2.2):

1. Εγκλιματισμός και καθαρισμός του στερεού προσροφητικού υλικού.
2. Διαπότιση του προσροφητικού υλικού με το υγρό δείγμα (1mL-1L).
3. Έκπλυση με κατάλληλο διαλύτη.
4. Έκλουση του αναλύτη συνήθως με κάποιον οργανικό διαλύτη.

Τόσο στο δεύτερο, όσο και στο τέταρτο στάδιο σημαντικό ρόλο για τον βαθμό προσυγκέντρωσης παίζει η ταχύτητα ροής των διαλυμάτων, καθώς σε μεγάλες ταχύτητες δεν επιτυγχάνονται μεγάλοι συντελεστές ανάκτησης. Η προσυγκέντρωση στερεής φάσης έχει πολλά πλεονεκτήματα, καθώς δεν απαιτεί μεγάλη κατανάλωση αντιδραστηρίων και διαλυτών, έχει μικρό κόστος και πραγματοποιείται σε μικρό χρονικό διάστημα. Με την τεχνική αυτή επίσης επιτυγχάνονται μεγάλοι συντελεστές ανάκτησης. Η εφαρμογή της τεχνικής αυτής στην προσυγκέντρωση ιχνοποσοτήτων από διαφορετικά δείγματα είναι εύκολη, λόγω του γεγονότος ότι τα προσροφημένα σωματίδια στην στερεή επιφάνεια έχουν σταθερότερη δομή από αυτή που έχουν όταν βρίσκονται στο διάλυμα. Επίσης η τεχνική αυτή έχει εφαρμογή σε



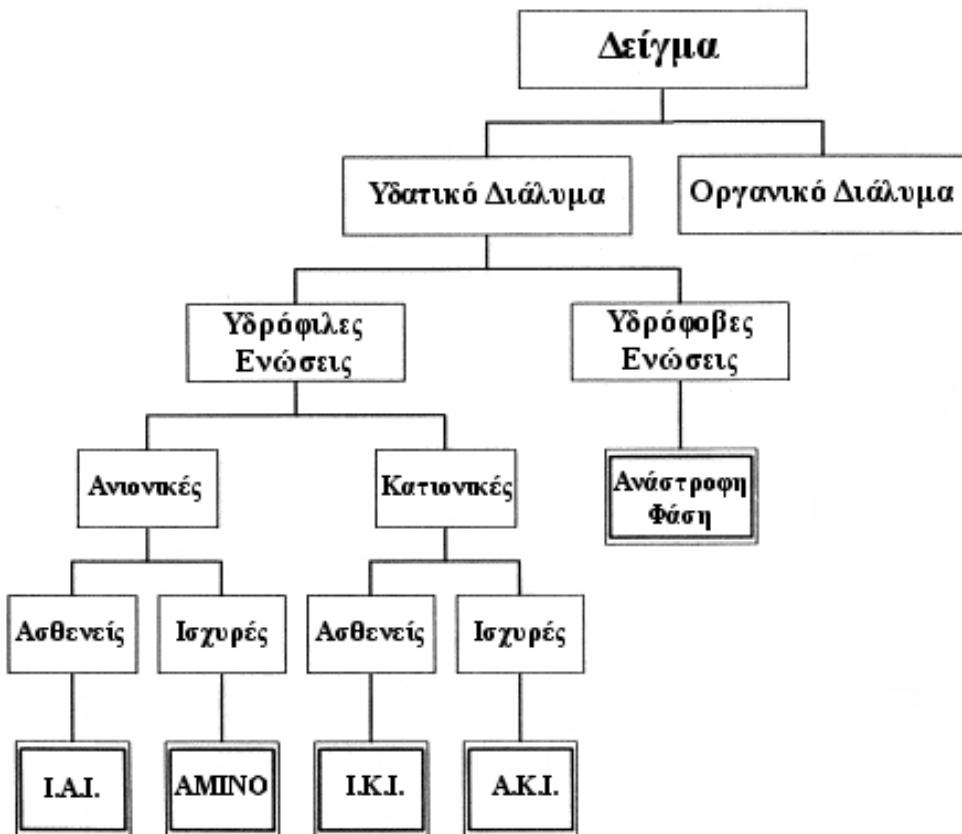
Σχήμα 2.2. Διαδικασία SPE.

περιβαλλοντικά δείγματα επειδή υπάρχει μεγάλος αριθμός στερεών προσροφητικών υλικών. [15]

2.3 Εφαρμογή SPE σε πολυσυστατικά υδατικά δείγματα

Η δυνατότητα των μεθόδων SPE για εκχύλιση πολυσυστατικών δειγμάτων από υδατικά διαλύματα είναι αποδεδειγμένη. Είναι επίσης σαφές ότι η ανάπτυξη εκλεκτικών προσροφητικών μέσων είναι στις μέρες μας ένας ενεργός τομέας της έρευνας. Όμως, δεν φτάνει απλά η χρήση τους για την ανάλυση πολυσυστατικών δειγμάτων, αφού πρέπει να ληφθούν υπόψη και κάποιες πρακτικές δυσκολίες, οι οποίες όμως μπορούν αρκετά εύκολα να υπερνικηθούν. Αυτές συνήθως αφορούν την επιλογή του προσροφητικού μέσου και του όγκου του δείγματος, καθώς επίσης και την ανάγκη να ρυθμιστεί το pH στο δείγμα. Απώλειες λόγω της διάσπασης των ενώσεων σε οργανικούς διαλύτες ή λόγω εξάτμισης μπορούν να παρακαμφθούν με την χρήση μιας on-line σύζευξης. Εντούτοις, μερικά από τα προβλήματα αυτά αφορούν τη φύση των ενώσεων και δεν μπορούν να λυθούν τόσο εύκολα.

Στο σχήμα 2.3 [16] παρουσιάζεται ένας γενικός οδηγός για την επιλογή προσροφητικού μέσου για την ανάλυση ενώσεων σε υδατικά διαλύματα. Από το δενδρόγραμμα γίνεται



Σχήμα 2.3. Επιλογή μεθόδου SPE για την απομόνωση οργανικών ενώσεων από υδατικά διαλύματα. (*I.A.I.* = Ισχυρός Ανιοντικός Ιονανταλλάκτης, *I.K.I.* = Ισχυρός Κατιοντικός Ιονανταλλάκτης, *A.K.I.* = Ασθενής Κατιοντικός Ιονανταλλάκτης) [16]

σαφές πως η επιλογή του προσροφητικού μέσου εξαρτάται από το αν οι προς εκχύλιση ενώσεις έχουν υδρόφοβο ή υδρόφιλο χαρακτήρα. Αυτό σημαίνει ότι η ταυτόχρονη εκχύλιση και υδρόφιλων και υδρόφοβων ενώσεων είναι ιδιαίτερα δύσκολη και απαιτεί την ανάπτυξη δύο διαδικασίων διαχωρισμού. Επιπλέον, η προσθήκη βημάτων καθαρισμού βασισμένων κυρίως σε μη συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις, όπως υδροφοβικές ή ιοντικές, αποδεικνύεται μερικές φορές δύσκολή, ή ακόμα και αδύνατη, στην ανάλυση ενώσεων με ευρία φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. [17]

Επομένως υπάρχει η ανάγκη ανάπτυξης νέων μεθόδων εκχύλισης στερεάς φάσης, οι οποίες θα μπορέσουν να αντιμετωπίσουν αποτελεσματικά την ταυτόχρονη εκχύλιση όλων των οργανικών συστατικών ενός δειγματος. Τα τελευταία χρόνια, η αναλυτική επιστήμη έχει προσανατολιστεί στη χρήση των επιφανειοδραστικών ενώσεων, μια κατηγορία ενώσεων πολλά υποσχόμενη σε αναλυτικές εφαρμογές.

Κεφάλαιο 3

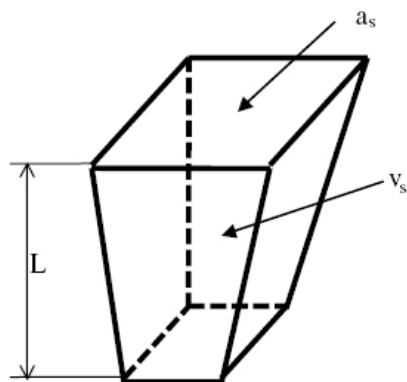
ΚΥΣΤΙΔΙΑ (Vesicles)

3.1 Εισαγωγή

Τα αμφίφιλα μόρια (αποκαλούνται επίσης επιφανειοδραστικά ή τασενεργά μόρια, λόγω των ιδιοτήτων επιφανειακής δράσης τους) αποτελούνται από ένα υδρόφοβο μέρος και μια υδρόφιλη ομάδα (head group). Λόγω αυτού του διπλού χαρακτήρα έχουν την τάση να σχηματίζουν μέσα σε υδατικά διαλύματα μια ποικιλία διαφορετικών μορφολογικά δομών [18, 19, 20, 21, 22]. Η κατευθυντήρια δύναμη για αυτήν την διαδικασία είναι η τάση του υδροφοβικού μέρους να αποφύγει την επαφή του με το ύδωρ (υδροφοβική επίδραση - hydrophobic effect) [23]. Τα διαφορετικά αυτά συσσωματώματα χυμαίνονται από σφαιρικά και ραβδοειδή, πχ. μικύλια, μέχρι και αμφίφιλες διπλοστιβάδες (bilayers). Η πραγματική μορφή που παίρνει ένα συσσωμάτωμα εξαρτάται από τη μοριακή κατάσταση του αμφίφιλου και μπορεί να εξηγηθεί με μια απλή γεωμετρική εκτίμηση. Έτσι, η γεωμετρία ενός αμφίφιλου περιγράφεται από την παράμετρο p (packing parameter), η οποία ορίζεται ως το πηλίκο του υδρόφοβου όγκου του μορίου (v_s) προς το γινόμενο της επιφάνειας της υδρόφιλης ομάδας (α_s) επί το μήκος της αλυσίδας του μορίου (λ_s) [24]:

$$p = \frac{v_s}{(\alpha_s \times \lambda_s)} \quad (3.1)$$

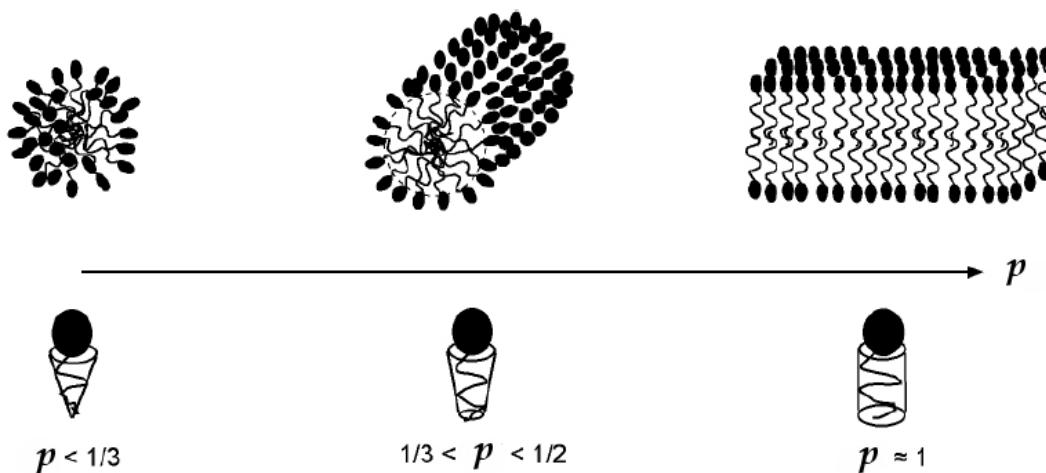
Η παράμετρος p καθορίζει την προτιμητέα κυρτότητα των σχηματιζόμενων συσσωμάτων (σχήμα 3.1). Έτσι για $p \leq 1/3$ έχουμε σφαιρική δομή, για $1/3 \leq p \leq 1/2$ ραβδοειδής δομή, για $1/2 \leq p$ δομή διπλοστιβάδας, ενώ για τιμές του p μεγαλύτερες από 2, αναμένονται αντίστροφες δομές (σχήμα 3.2). Γενικά αυτό το απλό σχέδιο λειτουργεί καλά για την εξήγηση πειραματικά παρατηρούμενων αμφίφυλων δομών.



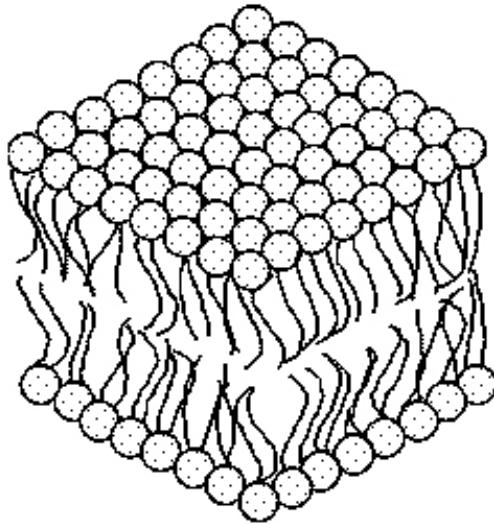
Σχήμα 3.1. Γεωμετρία ενός επιφανειοδραστικού μορίου.

Η ποιο κοινή περίπτωση είναι ο σχηματισμός αμφίφυλων διπλοστιβάδων, στις οποίες το υδρόφιλο πολικό μέρος έρχεται σε επαφή με τον πολικό διαλύτη και τα υδρόφοβα μέρη των αμφίφιλων αποτελούν το εσωτερικό των διπλοστιβάδων (σχήμα 3.3). Στην απλούστερη διάταξη, αυτές οι διπλοστιβάδες σχηματίζουν απλά επίπεδες δομές. Εντούτοις, είναι επίσης δυνατό οι διπλοστιβάδες να κυρτώνουν, ώστε τελικά να σχηματίζουν κλειστά αντικείμενα που καλούνται κυστίδια, τα οποία συνήθως έχουν μια σφαιρική μορφή (σχήμα 3.4). Φυσικά, τα κύστιδια δεν είναι στατικά, αλλά δυναμικά συστήματα όπου λαμβάνουν χώρα πολλές διακυμάνσεις στο σχήμα και το μέγεθός τους [25, 26, 27].

Τα κυστίδια μπορούν δομικά να υποδιαιρεθούν σε διάφορες κατηγορίες. Μια πρώτη μορφή είναι να εμφανίζουν μόνο μια ενιαία διπλοστιβάδα (μονοφυλλωτά κυστίδια - unilamellar



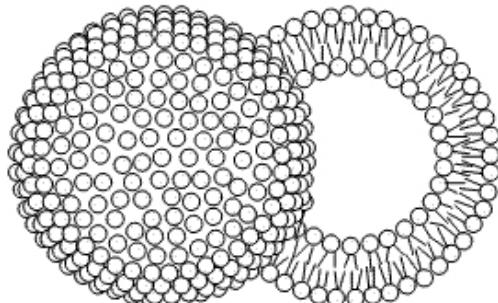
Σχήμα 3.2. Δομές συσσωμάτων επιφανειοδραστικών μορίων.



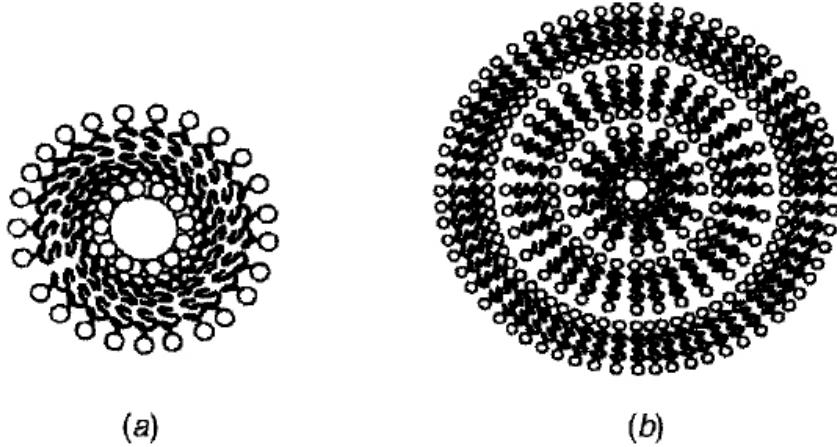
Σχήμα 3.3. Αμφίφιλη διπλοστιβάδα.

vesicles). Αυτά μπορούν να διακριθούν σε μικρά μονοφυλλωτά χυστίδια (small unilamellar vesicles - SUV, $R = 4\text{-}20\text{nm}$) και σε μεγάλα μονοφυλλωτά χυστίδια (large unilamellar vesicles - LUV, $R = 50\text{-}10000\text{nm}$). Αυτή η διάκριση μπορεί να γίνει με κριτήριο την επιβολή ή μη-επιβολή της κυρτότητας στην διαμόρφωση του σκελετού του μορίου. Κατά συνέπεια τα LUV προσδιορίζονται από τη σχέση $c \cdot L \ll 1$, όπου c είναι η κυρτότητα του χυστιδίου, δηλ. το αντίστροφο της ακτίνας του, και L η μέγιστη διάσταση του αμφίφιλου μορίου. Τα μονοφυλλωτά χυστίδια σχηματίζουν ισοτροπικά διαλύματα (έκτος όταν έχουμε μεγάλες συγκεντρώσεις, όπου μπορούν επίσης να σχηματιστούν πηκτές) τα οποία συχνά αναφέρονται ως “φάσεις L_4 ”.

Εκτός από την περίπτωση των μονοφυλλωτών χυστιδίων, μπορούμε να συναντήσουμε και πολλυφυλλωτά χυστίδια (multilamellar vesicles - MLV) [28] (όταν αναφερόμαστε σε



Σχήμα 3.4. Το χυστίδιο.



Σχήμα 3.5. Κυστίδια: (a) Μονοφυλλωτό (b) Πολυφυλλωτό

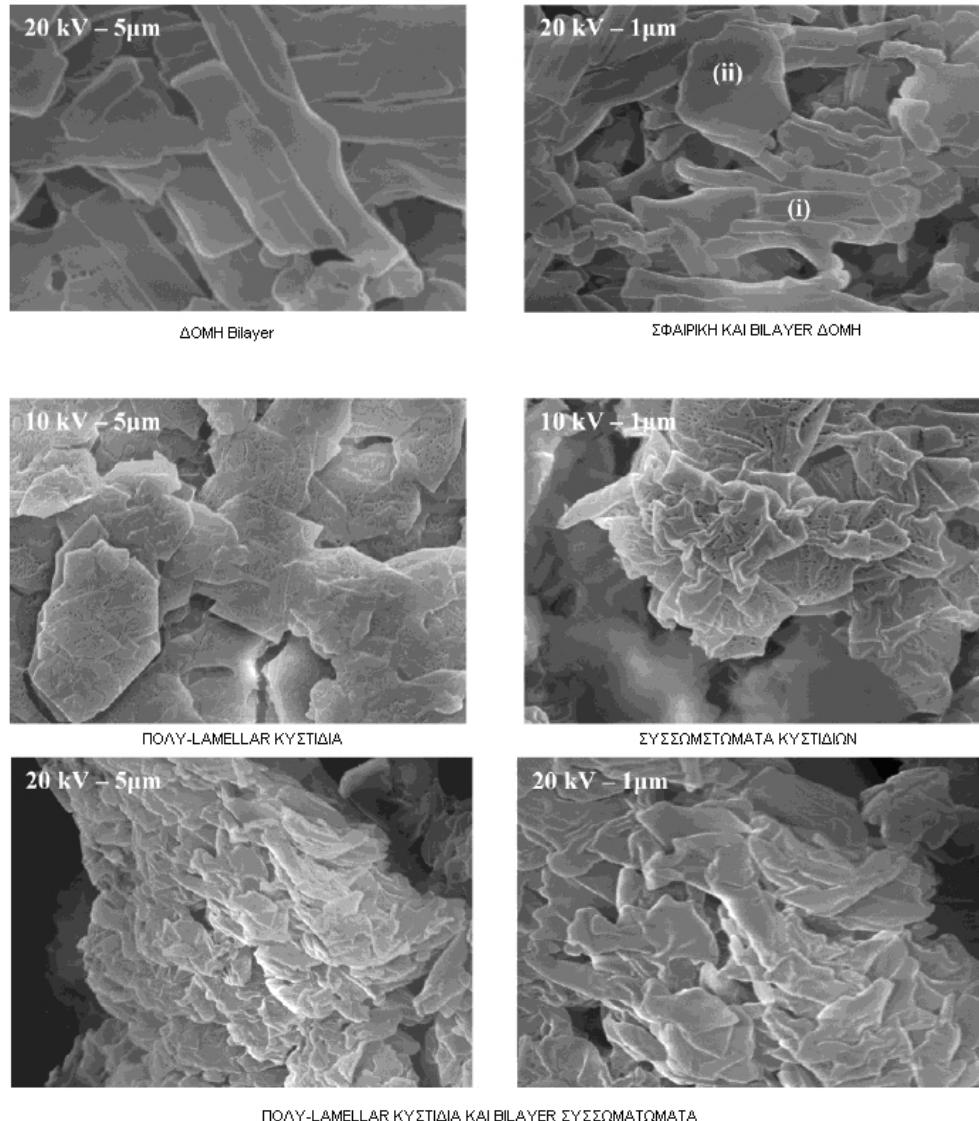
φωσφολιπίδια, συχνά τα λέμε λιποσώματα [30, 31]), όπου έχουμε πολλά ομόκεντρα αλληλεπικαλυπτόμενα κυστίδια (σχήμα 3.5).

Ο γενικός κανόνας είναι ότι τα μονοφυλλωτά κυστίδια είναι πιθανότερο να παρατηρηθούν σε αραιά συστήματα, ενώ τα πολλυφυλλωτά παρατηρούνται συχνά σε πυκνότερα διαλύματα επιφανειοδραστικών ουσιών. Χαρακτηριστικά, για αμφίφιλα συστήματα με τάση σχηματισμού διπλοστιβάδων, παρατηρούνται προοδευτικά οι εξής δομές:

μονοφυλλωτά κυστίδια \Rightarrow πολλυφυλλωτά κυστίδια \Rightarrow επίπεδες διπλοστιβάδες

Παραδείγματος χάριν, μια τέτοια τάση έχει παρατηρηθεί και έχει μελετηθεί λεπτομερώς για το μη ιοντικό επιφανειοδραστικό κοκοδιαιθανολαμίδιο [32]. Χαρακτηριστικά, κανένας μακροσκοπικός χωρισμός φάσης δεν παρατηρείται για τη μετάβαση από τα μονοφυλλωτά κυστίδια σε πολλυφυλλωτά ή από πολλυφυλλωτά κυστίδια σε επίπεδες διπλοστιβάδες. Αντ' αυτού, παρατηρούνται εκτεταμένες δομικά διφασικές και μακροσκοπικά ομοιογενείς περιοχές που περιέχουν διαφορετικές μορφολογικές δομές σε ισορροπία.

Σε ποιες περιπτώσεις, όμως, παρατηρούμε κυστίδια; Σαν πρώτη προϋπόθεση, τα υπάρχοντα αμφίφιλα πρέπει να έμφανίζουν την τάση να σχηματίζουν διπλοστιβάδες. Σύμφωνα με το γεωμετρικό πρότυπο, ο σχηματισμός των διπλοστιβάδων πρέπει να αναμένεται εάν η παράμετρος p είναι μεγαλύτερη από $1/2$ [24, 33]. Εντούτοις, μια σχετικά μεγάλη τιμή p απαιτεί μικρές υδρόφιλες ομάδες και ογκώδη υδρόφιβα μέρη. Συνήθως, αυτή η κατάσταση προκύπτει για αμφίφιλα διπλής αλυσίδας υδρογονανθράκων (π.χ. κανονικά φωσφολιπίδια), για επιφανειοδραστικές ενώσεις με φθοροανθρακική αλυσίδα (perfluoro surfactants - δεδομένου ότι μια μονάδα CF_2 καταλαμβάνει περισσότερο χώρο από μια



Σχήμα 3.6. SEM φωτογραφίες των κυστιδιακών συσσωματωμάτων [15]

CH_2), ή για μη ιοντικά επιφανειοδραστικά μονής αλυσίδας με μικρές υδρόφιλες ομάδες (π.χ. C_{12}E_4)[33]. Ένας άλλος τρόπος να αυξηθεί η παράμετρος p ενός συστήματος επιφανειοδραστικών είναι προσμειγνύοντας τα με έναν συνεπιφανειοδραστικό (π.χ. μια αλκοόλη μέσης αλυσίδας). Για πολλά ιοντικά επιφανειοδραστικά μια τέτοια μίξη οδηγεί σε σχηματισμό δομών διπλοστιβάδων [22, 35].

Τα κυστίδια είναι ενδιαφέροντα όχι μόνο από δομική άποψη, δεδομένου ότι είναι μια από τις κύριες δομές τις οποίες τα αμφίφιλα μπορούν να αυτο-σχηματίσουν, αλλά και λόγω της δυνατότητας τους να χρησιμοποιηθούν σε πολλές εφαρμογές. Τέτοια χλειστά συστήματα είναι και οι κυτταρικές μεμβράνες [36], οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη των φυσικών ιδιοτήτων των αμφίφιλων διπλοστιβάδων [37]. Επιπλέον, τα κυστίδια μπορούν να εγκλωβίσουν ενεργά μόρια και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν, για παράδειγμα, ως συστήματα μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών [38, 39] ή όπως στην παρούσα διατριβή, ως μέσο εκχύλισης οργανικών ενώσεων από υδατικά διαλύματα. Μια ιδιαίτερη εφαρμογή αυτού του είδους, όπου έχουν επικεντρώσει την προσοχή τους πολλοί επιστήμονες, είναι η χρήση λιποσωμάτων ως φορείς απαλλαγμένους από ιούς στη θεραπεία γονιδίων [40, 41]. Συνεπώς, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μια μεγάλη ποικιλία φαρμακευτικών και καλλυντικών εφαρμογών [42, 43].

3.2 Διεργασίες Σχηματισμού

Ένα κύριο σημείο που αφορά τα κυστίδια είναι το θέμα της προετοιμασίας τους, δεδομένου ότι σε πολλές περιπτώσεις ο σχηματισμός τους απαιτεί χρήση εξωτερικής ενέργειας. Παραδείγματος χάριν, συχνά τα κυστίδια σχηματίζονται με τη διασπορά φυλλωτών διπλοστιβάδων, όπου αυτή η διασπορά μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάλυση ή με χρήση εξωτερικής ενέργειας. Πρέπει, φυσικά, να σημειωθεί ότι η κατανομή του μεγέθους των κυστιδίων που σχηματίζονται επηρεάζεται έντονα από τη μέθοδο προετοιμασίας τους [32, 44].

Ειδικότερα, για το σχηματισμό κυστιδίων από σχετικά άκαμπτες διπλοστιβάδες, διάφορες μέθοδοι έχουν προταθεί. Αντιροσωπευτικό παράδειγμα τέτοιων αμφίφιλων ενώσεων με άκαμπτες διπλοστιβάδες είναι τα φωσφολιπίδια, τα οποία είναι τα κύρια αμφίφιλα που σχηματίζουν τις μεμβράνες των ζωντανών κυττάρων.

3.2.1 Σχηματισμός με Χρήση Εξωτερικής Ενέργειας (Υπέρηχοι ή Ανάδευση)

Η κλασικότερη μεθοδος σχηματισμού των κυστιδίων είναι η χρήση εξωτερικής ενέργειας στο υδατικό διάλυμα όπου βρίσκονται διασπαρμένα τα μόρια του επιφανειοδραστικού, συνήθως με χρήση υπερήχων (sonication) [42, 45, 46, 47].

Το ίδιο αποτέλεσμα μπορεί να επέλθει με έντονη ανάδευση. Έτσι, σε πολλές περιπτώσεις, μια δυνατή ανακίνηση ή περιδίνηση (vortexing) θα είναι ήδη επαρκής για τη μηχανική διασπορά του επιφανειοδραστικού στο διάλυμα προς σχηματισμό κυστιδίων [29, 30].

Πρέπει να σημειωθεί ότι η ανάδευση είναι η τυπική διαδικασία για την ομογενοποίηση των επιφανειοδραστικών δειγμάτων, δηλ. σε πολλές καταστάσεις όπου τα κυστίδια παρατηρούνται πειραματικά, ο σχηματισμός τους μπορεί να οφείλεται σε τέτοια ομογενοποίηση των δειγμάτων.

3.2.2 Αυθόρυμητος Σχηματισμός

Σε πολλές περιπτώσεις, τα κυστίδια σχηματίζονται μόνο μετά από χρήση εξωτερικής ενέργειας. Οι συνθήκες σχηματισμού τους είναι ένα πολύ σημαντικό σημείο και επίσης το θέμα της θερμοδυναμικής σταθερότητας τέτοιων κυστιδίων προκύπτει φυσικά από το γεγονός ότι σε πολλές καταστάσεις δεν διαμορφώνονται άμεσα, αλλά απαιτούν κάποιο εξωτερικό ερέθισμα.

Επομένως πρέπει να υπογραμμιστεί ότι ο αυθόρυμητος σχηματισμός των κυστιδίων είναι μια πολύ σημαντική διεργασία, αφού καμία εξωτερική κατευθυντήρια δύναμη δεν απαιτείται. Όμως, δεν είναι με κανένα τρόπο σαφές πώς ορίζεται η διαδικασία του αυθόρυμητου σχηματισμού των κυστιδίων, δεδομένου ότι σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις για την προετοιμασία των δειγμάτων είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί κάποια εξωτερική δύναμη στο σύστημα προκειμένου να το ομογενοποιήσει. Επομένως είναι πάντα μια ερωτηματικό κατά πόσο αυτή η δύναμη που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης μπορεί να είχε συμβάλει στο σχηματισμό των παρατηρηθέντων κυστιδίων και εάν αυτά δεν είχαν διαμορφωθεί καθόλου (ή είχαν διαμορφωθεί διαφορετικά) χωρίς τη χρήση της εξωτερικής ενέργειας.

Μια πρώτη παρατήρηση του αυθόρυμητου σχηματισμού κυστιδίων ήταν στην περίπτωση των διάλκυλ-διμέθυλ-αμμωνιακών επιφανειοδραστικών όταν τα αντισταθμιστικά ιόντα αλογονιδίων αντικαθίστανται από υδροξύλιο ή οξεικά [48, 49]. Ο λόγος για τη διαφορετική συμπεριφορά του υδροξειδίου του επιφανειοδραστικού και των αντίστοιχων αλογονιδίων είναι ότι το ίον υδροξυλίου έχει πολύ μεγαλύτερη συνάφεια με το νερό και επομένως τοποθετείται

κατά μέσον όρο μακρύτερα από τη φορτισμένη επιφάνεια του κυστιδίου. Επομένως η άπωση μεταξύ των υδρόφιλων φορτισμένων ομάδων γίνεται μεγαλύτερη και ως εκ τούτου αυξάνεται και η υδρόφιλη επιφάνεια, με αποτέλεσμα η ανομοιομορφία αυτή να είναι αιτία σχηματισμού κυρτών διπλοστιβάδων, δηλ. κυστιδίων. Σε τέτοια συστήματα, ακόμη και το μέγεθος των κυστιδίων μπορεί να ελεγχθεί μέσω μιας τιτλοδότησης με οξύ, η οποία οδηγεί σε αύξηση των παρατηρηθέντων κυστιδίων [49, 50]. Μια παρόμοια ισχυρή εξάρτηση του σχηματισμού των κυστιδίων με την παρουσία αντισταθμιστικού ιόντος έχει παρατηρηθεί για ανιοντικά επιφανειοδραστικά μόρια. Εδώ η ανταλλαγή του μονοσθενούς Na^+ του SDS (δωδεκυλοθειαικό νάτριο) με το δισθενές Ca^{2+} έχει βρεθεί να προκαλεί σχηματισμό κυστοειδών δομών. Αυτό έχει αποδοθεί στην ισχυρή σύνδεση του Ca^{2+} με δύο δωδεκυλοθειαικά ιόντα, εξομοιώνοντας αποτελεσματικά με αυτόν τον τρόπο ένα επιφανειοδραστικό μόριο διπλής αλυσίδας [51].

Μια άλλη περίπτωση αυθόρυμητου σχηματισμού κυστιδίων έχει αναφερθεί για υδατικά διαλύματα λιπαρών οξέων όπου τα κυστίδια διαμορφώνονται συναρτήσει του pH [52, 53, 54] με την απορροτονίωση του λιπαρού οξέος. Ως ένα τέτοιο σύστημα μπορούμε να θεωρήσουμε ένα ανιοντικό καρβοξυλικό επιφανειοδραστικό μόριο που περιέχει το αντίστοιχο οξύ ως συνεπιφανειοδραστικό. Αυξάνοντας την περιεκτικότητα σε λιπαρό οξύ μειώνεται η περιοχή της υδρόφιλης ομάδας ανά αμφίφιλο. Αντίστοιχα, η κυρτότητα των συσσωματωμάτων που σχηματίζονται γίνεται μικρότερη έως ότου διαμορφώνονται διπλοστιβάδες. Το ελαϊκό οξύ έχει χρησιμοποιηθεί επίσης ως συνεπιφανειοδραστικό μαζί με μίγμα ενός επαμφοτερίζοντος επιφανειοδραστικού κι ενός ανιοντικού επιφανειοδραστικού, όπου σε δεδομένη αναλογία των δύο αυτών ουσιών σχηματίζονται πολλυψυλωτά κυστίδια και μάλιστα για μια αρκετά μεγάλη περιοχή συγκέντρωσης 0,2-5% x.β. του επιφανειοδραστικού [55].

Εν τω μεταξύ, μια κλασική περίπτωση αυθόρυμητου σχηματισμού κυστιδίων είναι αυτή των “κατανιοντικών” (catanionic) συστημάτων, όπου τα κυστίδια σχηματίζονται με μίξη ενός κατιοντικού και ανιοντικού επιφανειοδραστικού. Σε τέτοια κατανιοντικά συστήματα, έχει παρατηρηθεί σχηματισμός κυστιδίων σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών καταστάσεων. Τα μίγματα ανιοντικών και κατιοντικών επιφανειοδραστικών μονής αλυσίδας γίνονται πολύ συχνά αντικείμενα μελέτης. Παραδείγματα τέτοιων συστημάτων περιλαμβάνουν SDS/DTAB[55], CTAB/SDBS [57, 58], DTAB/SDBS [59], και CTAB/SOS [60]. Για κατανιοντικά διαλύματα που δεν περιέχουν άλατα, έχει παρατηρηθεί ακόμη και σχηματισμός κανονικού κοίλου εικοσάεδρου [61].

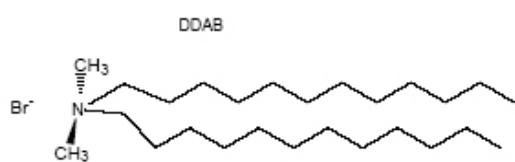
3.2.3 Άλλες Τεχνικές Σχηματισμού

Μια άλλη κλασική μέθοδος είναι η ενυδάτωση λεπτού φιλμ, όπου ένα λεπτό φιλμ αμφίφιλου υλικού δημιουργείται από εξάτμιση ενός διαλύματος αμφίφιλου σε χλωροφόρμιο ή άλλους πτητικούς διαλύτες. Κατόπιν αυτό το λεπτό φίλμ έρχεται σε επαφή με νερό και διαλύεται σχηματίζοντας κυστίδια [30].

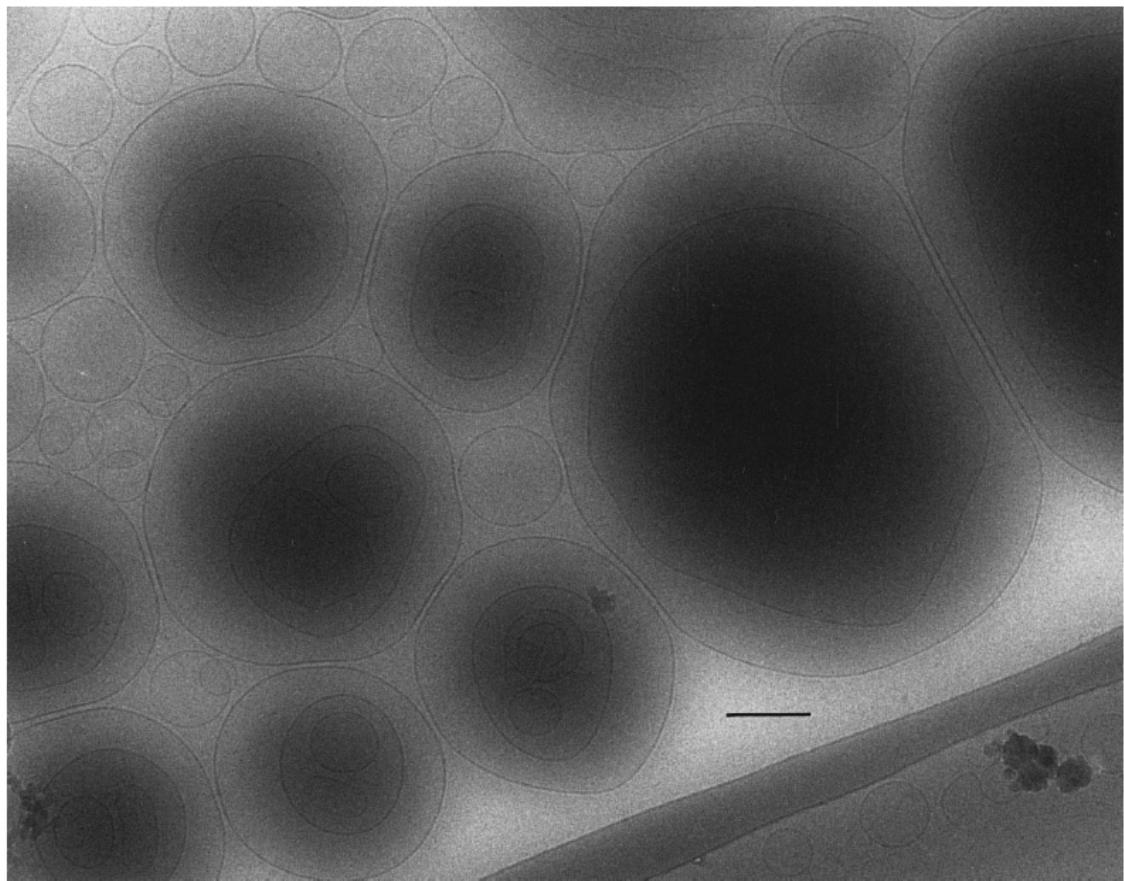
Μια άλλη τεχνική για την προετοιμασία κυστιδίων είναι η μέθοδος τεμαχισμού των φυλλωτών φάσεων (ή μέθοδος μικρορευστοποίησης) [62, 63], όπου η ανάδευση κομματίζει τις φυλλωτές δομές και από τα κομμάτια σχηματίζονται κυστίδια. Με την χρήση μεμβρανικών φίλτρων δεδομένου μεγέθους πόρων, αυτή η μέθοδος επιτρέπει επίσης το σχηματισμό σχετικά μονοδιεσπαρμένων κυστιδίων [63, 64]. Για μαλακές μεμβράνες (δεδομένου ότι είναι παρούσες σε διπλοστιβάδες που σχηματίζονται από μικρής αλυσίδας επιφανειοδραστικά ή συστήματα πλούσια σε συνεπιφανειοδραστικά), η απλή ανάδευση είναι αρκετή για να μετασχηματίσει τα φυλλωτά επίπεδα σε πολυφυλλωτά κυστίδια (βλ. σχήμα 3.5).

3.3 DDAB

Το βρωμιούχο διδωδέκυλ-διμέθυλ-αμμώνιο (DDAB) είναι μια επιφανειοδραστική ένωση διπλής αλυσίδας που ανήκει στην κατηγορία των κατιοντικών τεταρτοταγών επιφανειοδραστικών του αμμωνίου, η οποία είναι από τις πιο διαδεδομένες και εμπορικά διαθέσιμες. Για την ακρίβεια, ο σχηματισμός κυστιδίων από συνθετικά αμφίφιλα, έγινε για πρώτη φορά γνωστός το 1977 [65], με τη διάλυση DDAB σε νερό και χρήση υπερήχων. Σύμφωνα με την τιμή της παραμέτρου ρ του DDAB, η οποία υπολογίστηκε ίση με 0,62 [66], αυτό θα έπρεπε θεωρητικά να σχηματίζει κυστίδια ή φυλλωτές δομές. Ένας μεγάλος αριθμός εργασιών παρουσιάζει τα διαγράμματα φάσεως του δυαδικού συστήματος DDAB/νερού, όπου διαπιστώθηκε η παρουσία πολλυφυλλωτών κυστιδίων [67] σε συγκεντρώσεις DDAB μέχρι 30% κ.β. και προσδιορίστηκε η “κρίσιμη κυστιδιακή συγκέντρωση” (critical vesicle concentration - CVC) περίπου ίση με $6,5 \cdot 10^{-6}$ g/mL ($=0,014$ mmol/L) απλά διαλύωντας το στερεό στο νερό. Η διάμετρος τους μετρήθηκε με σκέδαση φωτός και ηλεκτρονική μικροσκοπία και βρέθηκε περίπου 100-120 Å [68].



Σχήμα 3.7. Το μόριο του DDAB.



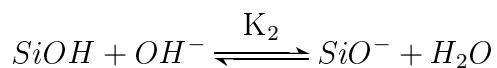
Σχήμα 3.8. Κυστίδια DDAB φωτογραφημένα με την τεχνική Cryo-TEM.

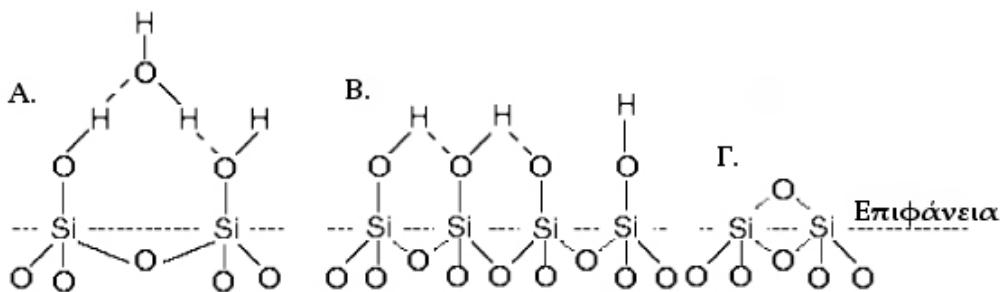
Κεφάλαιο 4

ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ

4.1 Χημεία Επιφάνειας της Πυριτίας

Ένα σημαντικό ποσοστό διαθέσιμης βιβλιογραφίας σχετικά με την προσρόφηση επιφανειοδραστικών ενώσεων σε επιφάνεια στερεού-υγρού αφορά την άμορφη πυριτία [69, 70, 71, 72]. Κατά συνέπεια, θα αναφερθεί εν συντομίᾳ η χημεία της πυριτίας. Η πυριτία είναι το χύριο συστατικό του φλοιού της γης και, κατά συνέπεια, η χημεία που συνδέεται με την επιφάνεια της έχει μελετηθεί ευρέως [73]. Η ακατέργαστη πυριτία αποτελείται από τετράεδρα SiO_4 που ενώνονται μαζί σε ποικίλες διατάξεις σε διάφορες δομές. Αρκετές διαφορετικές δραστικές σωματιδιακές μορφές μπορούν να είναι παρούσες στην επιφάνεια της πυριτίας, ανάλογα πάντα με την προεργασία της, ή εάν βρίσκεται σε διάλυμα, με τη φύση του διαλύματος. Οι δραστικές σωματιδιακές μορφές στην επιφάνεια της πυριτίας απεικονίζονται στο σχήμα 4.1. Όπως άλλες επιφάνειες ανόργανων οξειδίων, η πυριτία έχει έναν φορτίο επιφάνειας που καθορίζεται από τις σχετικές συγκεντρώσεις H^+ και OH^- του διαλύματος, όπως παρουσιάζεται στις ακόλουθες ισορροπίες:





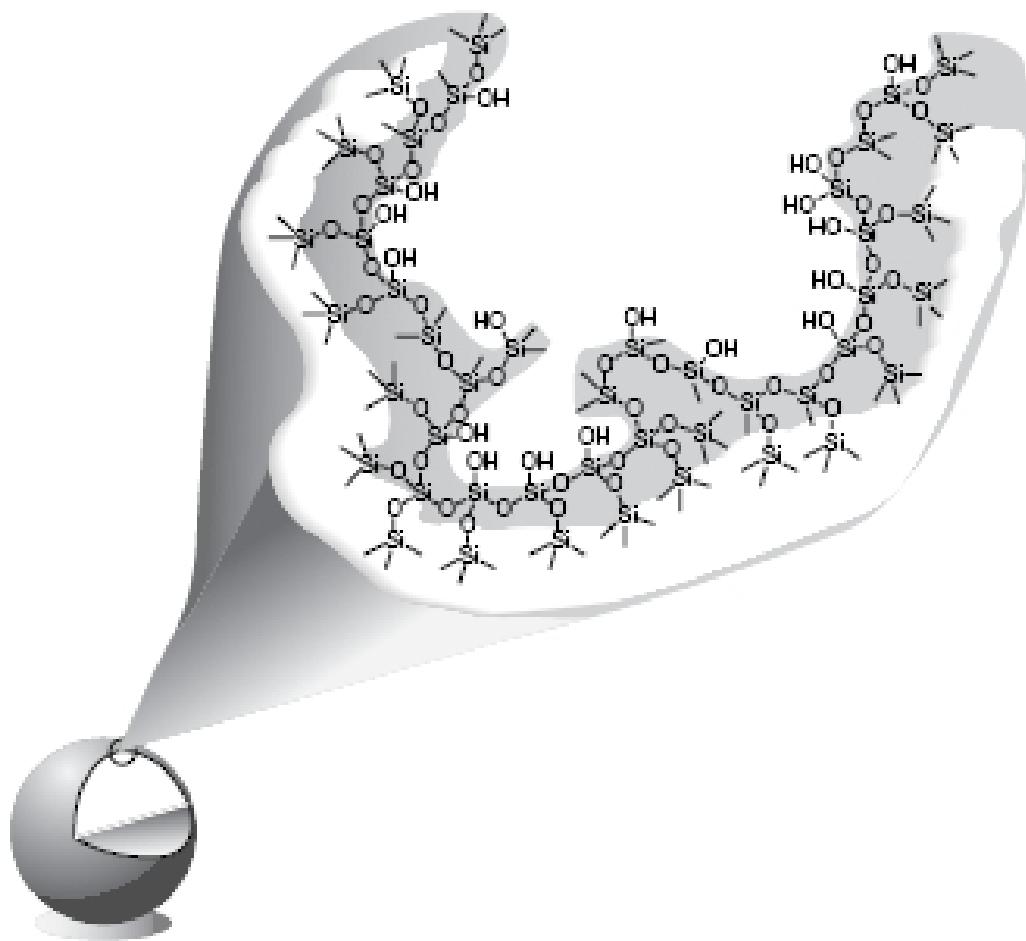
Σχήμα 4.1. Σχηματική παράσταση των τύπων των ενεργών ομάδων στην επιφάνεια της πυριτίας. (α) Ένυδρη (β) Άνυδρη (γ) Αφυδατωμένη

Η τιμή των σταθερών ισορροπίας K_1 και K_2 είναι αυτή που καθορίζει το φορτίο της επιφάνειας της πυριτίας. Το σημείο μηδενικού επιφανειακού φορτίου για τη πυριτία εμφανίζεται σε pH περίπου 2 [73] και κατά κάποιον τρόπο εξαρτάται από την φύση της επιφάνειας. Η πυκνότητα των αρνητικών φορτίων παραμένει χαμηλή μέχρι το pH του διαλύματος φθάσει σε 6, αλλά αυξάνεται αισθητά μεταξύ pH 6 και 11 [74]. Συγχρινόμενη με άλλες χαρακτηρισμένες επιφάνειες ανόργανων οξειδίων, η καμπύλη του επιφανειακού φορτίου έναντι του pH για τη πυριτία είναι ασυνήθιστη [70, 74, 75], και οι μελέτες διαμόρφωσης δείχνουν ότι το δυναμικό της επιφάνειας της πυριτίας ως συνάρτηση του pH δεν υπακούει στην εξίσωση Νερνστ [76].

4.2 Ισόθερμοι Προσρόφησης

4.2.1 Εισαγωγή

Ο παραδοσιακός προσδιορισμός των ισόθερμων προσρόφησης επιφανειοδραστικής ένωσης γίνεται με μεθόδους εξάντλησης διαλύματος (solution depletion methods) [77]. Αυτό επιτυγχάνεται με την ανάμιξη ενός διαλύματος επιφανειοδραστικών ουσιών με δεδομένη μάζα προσροφητικού μέσου γνωστής επιφανείας. Μετά την ισορροπία, το ποσό της προσρόφησης προσδιορίζεται από την μεταβολή στη συγκέντρωση του επιφανειοδραστικού στο διάλυμα. Προκειμένου να διευκολυνθεί η μέτρηση της συγκέντρωσης του διαλύματος, συνήθως επιλέγονται για μελέτη επιφανειοδραστικές ενώσεις που απορροφούν στην περιοχή υπεριώδους-ορατού. Η ισόθερμος προσρόφησης προσδιορίζεται τελικώς με μια σειρά μετρήσεων διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων επιφανειοδραστικού.



Σχήμα 4.2. Επιφάνεια ενός σωματιδίου πυριτίας.

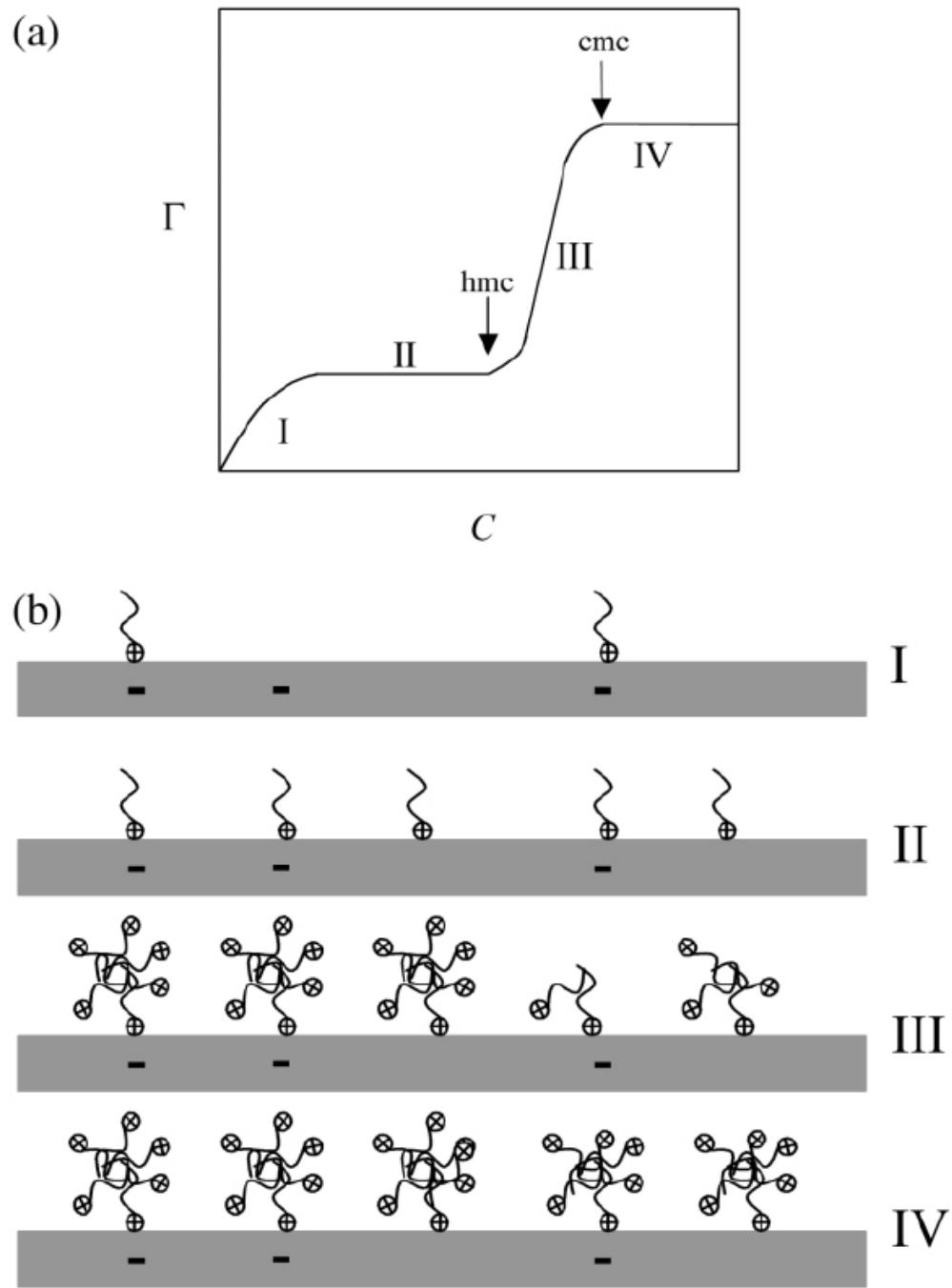
4.2.2 Ανάλυση των Ισοθέρμων Προσρόφησης

Η περισσότερη βιβλιογραφία σχετικά με τις ισόθερμες προσρόφησης προηγείται χρονικά των μελετών μορφολογίας της προσροφημένης στιβάδας [77]. Κατά συνέπεια, τα διάφορα πρότυπα που προτάθηκαν να περιγράψουν τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της ισόθερμου, ήδιαίτερα τον κορεσμό της επιφάνειας, περιγράφουν συχνά απλές μονοστιβάδες και διπλοστιβάδες. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με πιο πρόσφατα στοιχεία όπου προτείνονται σε πολλές περιπτώσεις ήδιαίτερη συνάθροιση πάνω στην επιφάνεια. Εντούτοις, αυτό δεν απορρίπτει την ανάλυση της ισόθερμου στην προσπάθεια κατανόησης της προσροφητικής διαδικασίας, ήδιαίτερα κάτω από την “χρίσιμη συγκέντρωση συσσωμάτωσης στην επιφάνεια” (critical surface aggregation concentration - CSAC). Σε αυτήν την προ-συσσωματωμάτων περιοχή της ισόθερμου, ακόμη και οι πιο πρόσφατες πειραματικές μέθοδοι αποδίδουν μόνο κάποιες αναποτελεσματικές ενδείξεις της δομής του προσροφημένου στρώματος. Οι ισόθερμοι προσρόφησης παρέχουν ήδιαίτερα χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που εμφανίζονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις του επιφανειοδραστικού και επίσης εξετάζουν τον τρόπο με τον οποίο το επιφανειακό φορτίο προσαρμόζεται καθώς οι συνθήκες του διαλύματος και η επικάλυψη της επιφάνειας μεταβάλλονται.

Γενικά, οι ισόθερμοι προσρόφησης ερμηνεύονται διακρίνοντας τις αλλαγές στο ποσό αύξησης της επιφανειακής επικάλυψης αναλογικά με τη συγκέντρωση του διαλύματος. Αυτό επιτρέπει την ισόθερμο να διαιρεθεί σε περιοχές, εξακριβώνοντας έτσι και την πλέον πιθανή διαμόρφωση του προσροφημένου επιφανειοδραστικού σε κάθε μια από αυτές τις περιοχές. Οι πιο κοινές προσεγγίσεις ερμηνεύουν τις ισόθερμους χρησιμοποιώντας το μοντέλο των “δύο σταδίων” και το μοντέλο των “τεσσάρων περιοχών”. Με μια πρώτη ματιά αυτά τα πρότυπα φαίνονται τελείως διαφορετικά, αλλά στην πραγματικότητα έχουν πολύ κοινά σημεία. Και τα δύο πρότυπα διαιρούν την ισόθερμο σε τέσσερα τμήματα, και υπάρχει καλή συμφωνία σχετικά με τον προσανατολισμό του προσροφημένου επιφανειοδραστικού στις περισσότερες περιοχές. Η κύρια διαφορά μεταξύ των προτύπων διακρίνεται στην περιοχή στην οποία αρχίζει η συνάθροιση των συσσωματωμάτων προς σχηματισμό “μυκιλίων ή κυστιδίων προσρόφησης” (admicelles ή advesicles). Το πρότυπο τεσσάρων περιοχών προβλέπει ότι ο σχηματισμός των συσσωματωμάτων πραγματοποιείται στη δεύτερη περιοχή, ενώ στο πρότυπο των δύο σταδίων ο σχηματισμός εμφανίζεται σε υψηλότερη συγκέντρωση, στην τρίτη περιοχή. Η δημιουργία “μυκιλίων προσρόφησης” περιγράφεται από το μοντέλο των “δύο σταδίων”, ενώ των “κυστιδίων προσρόφησης” περιγράφεται από το μοντέλο των “τεσσάρων περιοχών”.

4.2.3 Μοντέλο “Δύο Σταδίων”

Εκφραζόμενες σε γραμμική κλίμακα, οι ισόθερμοι προσρόφησης παρουσιάζουν δύο ‘πλατώ’ [78] και μια απότομη αύξηση στην επικάλυψη της επιφάνειας κοντά στο σημείο της ‘χρίσιμης μυκιλιακής συγκέντρωσης’ (cmc). Η βιβλιογραφία περιέχει πολλές περιγραφές



Σχήμα 4.3. Μοντέλο “δύο σταδίων” της προσρόφησης επιφανειοδραστικών ουσιών στην επιφάνεια της πυριτίας. (a) Ισόθερμος Προσρόφησης (b) Προτεινόμενο Μοντέλο [83]

του μοντέλου προσρόφησης “δύο σταδίων” [79, 80, 81, 82, 83, 84]. Σε εργασίες δημοσιευμένες πριν το 1994, όπου έγινε πρώτη φορά χρήση της Μικροσκοπίας Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Microscopy - AFM) για τη φωτογράφηση των προσροφημένων στιβάδων επιφανειοδραστικών [85], το σχήμα της ισόθερμης συχνά ερμηνευόταν ως ενδεικτικό μονοστιβάδας πάνω σε υδρόφιλη επιφάνεια, μέχρι που ο Gao [83], σε μελέτη προσρόφησης αλογονούχων αλκυλοπυριδινών σε πυριτία, προσδιόρισαν δύο περιοχές ‘πλατώ’, οι οποίες βρισκόταν σε χαμηλή συγκέντρωση και μετά το σημείο της “χρίσιμης μυκιλιακής συγκέντρωσης”. Αυτό κατέληξε στην πρόταση του εν λόγω μοντέλου προσρόφησης, όπως φαίνεται στο σχήμα 4.3, το οποίο αποτελείται από τέσσερις περιοχές: (I) περιοχή χαμηλής επιφανειακής κάλυψης, (II) πρώτη περιοχή ‘πλατώ’, (III) περιοχή υδρόφοιβης αλληλεπίδρασης, και (IV) δεύτερη περιοχή ‘πλατώ’.

Προτάθηκε ότι μέσα στην περιοχή (I) το επιφανειοδραστικό μόριο προσροφάται μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στο υπόστρωμα πυριτίας. Η προσρόφηση είναι αραιή, έτσι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προσροφημένων επιφανειοδραστικών μορίων είναι αμελητέες.

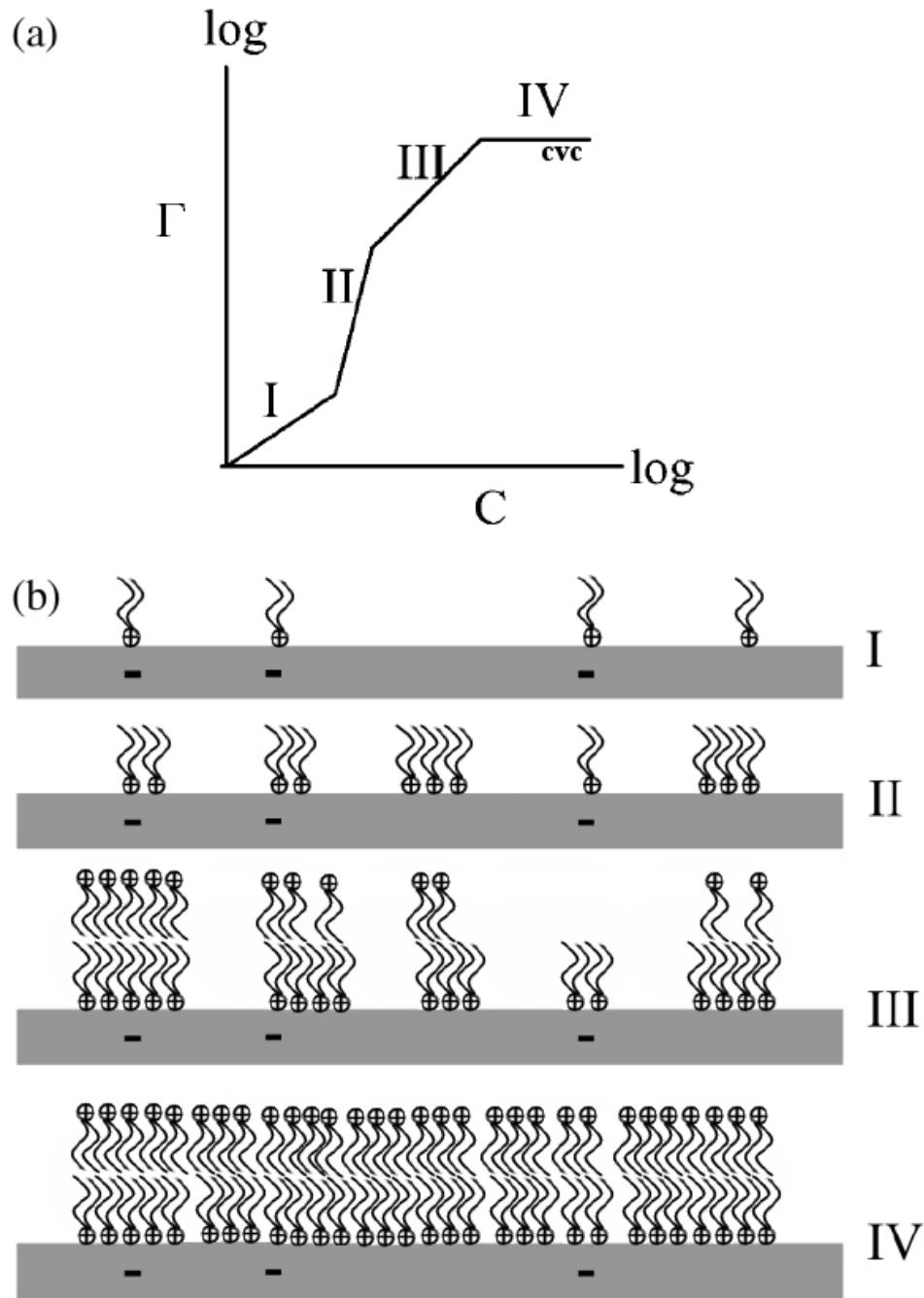
Στην περιοχή (II), το φορτίο της επιφάνειας έχει εξουδετερωθεί. Εντούτοις, η ενεργότητα του διαλύματος του επιφανειοδραστικού δεν είναι αρκετή για να οδηγήσει σε οποιαδήποτε μορφή συσσωματωμάτων επιφανειοδραστικών στην επιφάνεια, οπότε προσροφούνται ακόμα ως μονομερή.

Η απότομη αύξηση της προσρόφησης (σημείο hmc) δηλώνει την αρχή της περιοχής (III). Σε αυτήν την περιοχή, η συγκέντρωση του διαλύματος επιφανειοδραστικών είναι επαρκής για να οδηγήσει σε υδροφοιβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονομερών. Τα μονομερή που ηλεκτροστατικά προσροφήθηκαν στην περιοχή (II) ενεργούν ως πυρήνες σχηματισμού “μικυλίων προσρόφησης” (admicells) [83].

Η περιοχή (IV) εμφανίζεται πάνω από την “χρίσιμη μυκιλιακή συγκέντρωση” (cmc), όπου και έχουμε μια κορεσμένη επιφάνεια από admicells.

4.2.4 Μοντέλο “Τεσσάρων Περιοχών”

Ενώ ο τύπος ανάλυσης σε “δύο στάδια” εξηγεί επαρκώς πολλά από τα κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα των ισόθερμων προσρόφησης, δεν είναι η μόνη διαθέσιμη μέθοδος αξιολόγησης. Οι Somasundaran και Fuerstenau πρότειναν το μοντέλο των “τεσσάρων περιοχών” για την ερμηνεία των ισόθερμων προσρόφησης επιφανειοδραστικών ενώσεων, το οποίο είναι σχεδιασμένο σε λογαριθμική-λογαριθμική κλίμακα [86]. Αυτό το μοντέλο έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα επιτυχές στην ερμηνεία της προσρόφησης σε αλούμινα και ρουτίλιο [72, 86]. Το κύριο πλεονέκτημα της χρήσης ενός λογαριθμικού-λογαριθμικού διαγράμματος είναι ότι ενισχύει τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της ισόθερμου στις περιοχές χαμηλής επικάλυψης



Σχήμα 4.4. Μοντέλο “τεσσάρων περιοχών” της προσρόφησης επιφανειοδραστικών ουσιών στην επιφάνεια της πυριτίας. (a) Ισόθερμος Προσρόφησης (b) Προτεινόμενο Μοντέλο [87]

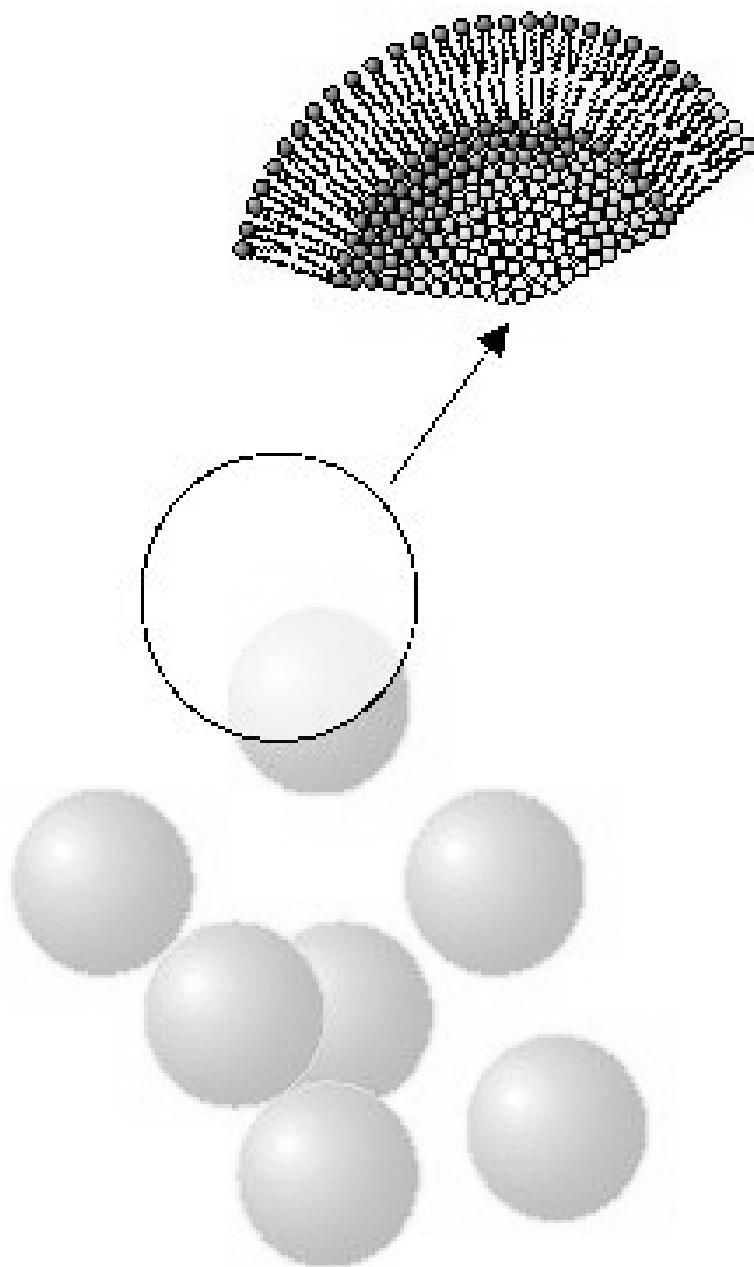
της επιφάνειας. Η γενική μορφή της ισοθέρμου που σχεδιάζεται με αυτόν τον τρόπο, καθώς και η μορφολογία των προσροφημένων δομών που συνδέονται με την κάθε περιοχή απεικονίζονται σχηματικά στο σχέδιο 4.4.

Στην περιοχή I του ισόθερμου, τα επιφανειοδραστικά μονομερή προσροφώνται ήλεκτροστατικά στο υπόστρωμα πυριτίας, με τις υδρόφιλες ομάδες σε επαφή με την επιφάνεια. Οι υδρόφοβες υδρογονανθρακικές ομάδες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με οποιεσδήποτε υδροφοβικές περιοχές στο υπόστρωμα.

Η περιοχή II περιλαμβάνει ισχυρή πλευρική αλληλεπίδραση μεταξύ των προσροφημένων μονομερών, με συνέπεια το σχηματισμό των αρχικών συσσωματωμάτων. Με χρήση τεχνικών όπως φασματοσκοπία Raman, φθορισμομετρία, συντονισμό ηλεκτρονιακού spin (esr) και μέτρηση των γωνιών επαφής, ο Somasundaran [87, 88, 89, 90] έδειξε ότι τα επιφανειοδραστικά μόρια είναι προσροφημένα με τις υδρόφιλες ομάδες προσανατολισμένες προς την επιφάνεια ενώ οι υδρόφοβες υδρογονανθρακικές ομάδες προεξέχουν στο διάλυμα. Αυτό δημιουργεί υδροφοβικές περιοχές στην επιφάνεια. Στο πρότυπο “τεσσάρων περιοχών”, αυτός ο τύπος συνόλου είναι γνωστός ως “ημίμυκιλλο” (hemimicelle).

Οι αυξήσεις στην κάλυψη της επιφάνειας στην περιοχή III προκύπτουν από την επέκταση των δομών που διαμορφώθηκαν στην περιοχή II, χωρίς όμως οποιαδήποτε αύξηση στον αριθμό των συσσωματομάτων στην επιφάνεια. Η παρουσία ξανά υδρόφιλων ομάδων στο διάλυμα καθιστά την επιφάνεια υδρόφιλη ακόμα μια φορά. Η μετάβαση από την περιοχή II στην περιοχή III οφείλεται πιθανά στην πλήρη εξουδετέρωση της φορτίου επιφάνειας. Ο τύπος δομής που σχηματίζεται είναι γνωστός ως “κυστίδιο προσρόφησης” (advesicle).

Τέλος, στην περιοχή IV, η επιφάνεια καλύπτεται πλήρως από διπλοστιβάδες. Περαιτέρω αυξήσεις στη συγκέντρωση επιφανειοδραστικών στο διάλυμα δεν οδηγούν σε αύξηση στην επικάλυψη της επιφάνειας.



Σχήμα 4.5. Σχηματική παράσταση Κυστιδίου Προσρόφησης. Διακρίνεται ο πυρήνας της πυριτίας και η προσροφημένη διπλοστιβάδα.

Κεφάλαιο 5

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

5.1 Εισαγωγή

Με τον όρο “χρωματογραφία” μπορεί να οριστεί η φυσική μέθοδος διαχωρισμού, κατά την οποία τα προς διαχωρισμό συστατικά κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων, η μία εκ των οποίων συνίσταται από ένα σταθερό στρώμα μεγάλης επιφάνειας, την στατική φάση, ενώ η άλλη από ένα υγρό, την κινητή φάση, που διατρέχει διαμέσου ή κατά μήκος της στατικής φάσης και μεταφέρει τα προς διαχωρισμό συστατικά με διαφορετικές ταχύτητες μετακίνησης. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται συνήθως λόγω των διαφορών στην ισορροπία κατανομής των υπό διαχωρισμό συστατικών μεταξύ των δύο φάσεων (της στατικής και της κινητής). Οι ταχύτητες μετακίνησης τέτοιων συστατικών είναι συνήθως ανάλογες του συντελεστή κατανομής. Επομένως, ουσίες με μεγάλο συντελεστή κατανομής στη στατική φάση μετακινούνται πιο αργά και μπορούν να διαχωριστούν από ουσίες με μικρό συντελεστή κατανομής στη στατική φάση. Πράγματι, εάν δεν υπάρχει αυτή η διαφορά στην κατανομή, δεν υπάρχει διαφοροποίηση στην ταχύτητα μετακίνησης και επομένως δεν επιτυγχάνεται διαχωρισμός [91, 92].

Η προέλευση της χρωματογραφίας ανάγεται στα πειράματα του Runge στην τριχοειδή ανάλυση. Ο Davy παρατήρησε αλλαγές στη σύσταση του αργού πετρελαίου όταν ερχόταν σε επαφή με πετρώματα που είχαν προσροφητικές ιδιότητες. Αυτές οι αναφορές μπορούν να θεωρηθούν ως μέρος της ανάπτυξης της χρωματογραφίας. Το 1903 και 1906 αντίστοιχα ο Ρώσος βιτανολόγος, ο Michael Tswelt [93, 94] δημοσίευσε τις παρατηρήσεις του σχετικά

με το διαχωρισμό φυτικών χρωστικών με χρωματογραφία προσρόφησης. Ο διαχωρισμός περιλάμβανε το σχηματισμό μιας σειράς πράσινων και κίτρινων ταινιών και ως εκ τούτου ο όρος “χρωματογραφία” παρέμεινε από το συγκεκριμένο ιστορικό πείραμα. Η πρωτοποριακή εργασία των Martin και Synge [95] έθεσε τις βάσεις για την ανάπτυξη άλλων μορφών χρωματογραφίας. Η χρονολογική ανάπτυξη των τεχνικών διαχωρισμού της χρωματογραφίας φαίνεται στον πίνακα 5.1.

Πίνακας 5.1. Χρονολογική σειρά ανάπτυξης χρωματογραφικών τεχνικών.

Τεχνική	'Ετος Ανακάλυψης
Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (TLC)-Προσρόφησης	1938
Χρωματογραφία κατανομής	1941
Χρωματογραφία χάρτου (PC)	1944
Counter Current distribution (κατανομής)	1944
Χρωματογραφία διαπερατότητος πυκτής (GPC)	1945
Αέριος χρωματογραφία	1946
Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων	1947
Ηλεκτροφόρηση	1948
Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας - κατανομής	1951
Αέρια-υγρή χρωματογραφία (GLC)	1952
Χρωματογραφία Ιονοανταλλαγής (IEC Partition)	1963
Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	1967
Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC)	1974
Ιοντική χρωματογραφία	1975

5.1.1 Ταξινόμηση χρωματογραφικών μεθόδων

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι ταξινόμησης των χρωματογραφικών μεθόδων. Συνήθως οι χρωματογραφικές μέθοδοι ταξινομούνται σύμφωνα ρε τον τύπο της στατικής και της κινητής φάσης που χρησιμοποιείται, τη μορφή την οποία έχει η κάθε φάση, και το μηχανισμό ο

οποίος ευθύνεται για το διαχωρισμό. Μερικοί από τους πιο ευρέως διαδομένους τύπους της χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται είναι οι ακόλουθοι:

1. Αέριος χρωματογραφία (GC) υπό τις εξής μορφές:
 - (i) Αέριος - υγρή χρωματογραφία (GLC) και
 - (ii) Αέριος - στερεά χρωματογραφία (GSC)
2. Υγρή χρωματογραφία (LC) υπό τις εξής μορφές:
 - (i) Υγρή - στερεά (προσροφήσεως) χρωματογραφία (LSC)
 - (ii) Υγρή - Υγρή (κατανομής) χρωματογραφία (LLC)
 - (iii) Χρωματογραφία ιονοανταλλαγής (IHC)
 - (iv) Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)
 - (v) Χρωματογραφία χάρτου (PC)
 - (vi) Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

5.1.2 Αέριος χρωματογραφία

Περιλαμβάνει όλες τις χρωματογραφικές μεθόδους στις οποίες η κινητή φάση είναι αέρια [96]. Η πρώτη πρακτική εφαρμογή της αέριας χρωματογραφίας έγινε από τον Claesson στο τέλος της δεκαετίας του 1940. Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος με αέριο χρωματογραφία επιτυγχάνεται λόγω διαφορών στην κατανομή του κάθε συστατικού μεταξύ της ενεργού στατικής φάσης και της αέριας κινητής φάσης. Έτσι τα διάφορα συστατικά μετακινούνται κατά μήκος της στήλης με διαφορετική ταχύτητα. Συγχρινόμενη με παλαιότερες χρωματογραφικές μεθόδους, η αέριος χρωματογραφία παρέχει διαχωρισμούς ταχύτερους και καλύτερους. Ωστόσο πολλές ουσίες δεν είναι δυνατόν να προσδιορισθούν με αέριο χρωματογραφία: Είτε διότι δεν είναι επαρκώς πτητικές και δεν μπορούν να περάσουν μέσα από την στήλη, είτε διότι είναι θερμικά ασταθείς και διασπώνται κάτω από τις συνθήκες διαχωρισμού [97]. Όταν η στατική φάση είναι ένα ενεργό στερεό, προσροφητικό υλικό η διαδικασία καλείται αέριος - στερεά χρωματογραφία (GSC), ενώ όταν η στατική φύση - υποστηριζόμενη από ένα στερεό - είναι ένα παχύρευστο υγρό το οποίο συμπεριφέρεται ως διαλύτης για τα συστατικά του δείγματος, η διαδικασία ονομάζεται αέριος - υγρή χρωματογραφία (GLC).

5.1.3 Χρωματογραφία αέριου-στερεού

Ο συνδυασμός αυτός χρησιμοποιήθηκε πριν από το 1800 για τον καθαρισμό διαφόρων αερίων. Έγινε γνωστός όμως το 1940 με τις εργασίες των Hesse, Claesson και Phillips. Το είδος αυτό της χρωματογραφίας στα πρωταρχικά στάδια της πρακτικής της εφαρμογής παρουσίασε πολλά μειονεκτήματα που σχετίζονταν με το είδος της στατικής φύσης. Πολλά από τα προβλήματα αυτά λύθηκαν με “βελτίωση” των στατικών φάσεων ή και αντικατάσταση τους.

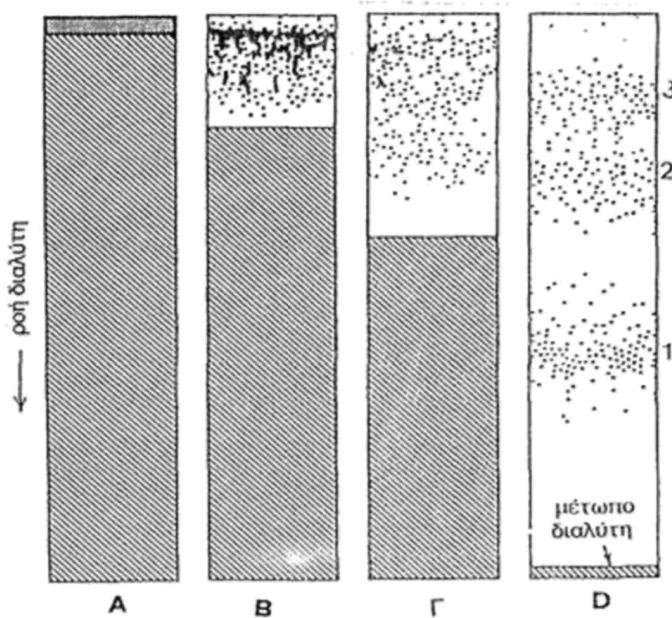
5.1.4 Χρωματογραφία αερίου-υγρού

Το είδος αυτό της χρωματογραφίας (που ονομάζεται από τους αναλυτές GLC) είναι η χρησιμότερη και η πιο ευρέως διαδεδομένη μέθοδος διαχωρισμού. Όταν ανακαλύφθηκε το 1952 από τους James και Mailin έφερε μια επανάσταση στην ενόργανη ανάλυση. Το σοβαρότερο πρόβλημα αυτής της χρωματογραφίας είναι ότι τα διάφορα συστατικά του μίγματος θα πρέπει να έχουν μια τάση ατμών τουλάχιστον μερικά torr στη θερμοκρασία της στήλης. Το μέγεθος των χρησιμοποιούμενων δειγμάτων μπορεί να είναι από ένα μικρογραμμάριο μέχρι 100 γραμμάρια. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι μπορεί να ανιχνευθούν με τη μέθοδο αυτή 10^{-15} g ουσίας [97].

5.2 Υγρή Χρωματογραφία

Περιλαμβάνει κάθε χρωματογραφική μέθοδο, στην οποία η κινητή φάση είναι υγρή. Σε αντίθεση με την αέρια κινητή φάση της αέριας χρωματογραφίας. Η παραδοσιακή χρωματογραφία ανοιχτής στήλης (προσροφήσεως, κατανομής ή ιονανταλλαγής), η χρωματογραφία ανοιχτή λεπτής στιβάδας, χάρτου ή υψηλής απόδοσης, είναι παραδείγματα υγρής χρωματογραφίας. Το σχήμα 5.1 δείχνει τον υποθετικό διαχωρισμό ενός μίγματος τριών συστατικών με στήλη υγρής χρωματογραφίας. Στην σχηματική διάταξη μπορούμε να διακρίνουμε τέσσερα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης κάποιας υποθετικής έκλουσης: α) την εφαρμογή (προσθήκη) του δείγματος στην στήλη β) την έναρξη εκροής της κινητής φάσης δια μέσου της στήλης, με αποτέλεσμα τα μόρια του δείγματος να μετακινούνται κατά μήκος της στήλης και να διαχωρίζονται μερικώς στα συστατικά Α, Β και Γ. γ) το διαχωρισμό των ενώσεων στη στήλη δ) την ανίχνευση αυτών στον ανιχνευτή.

Στην υγρή χρωματογραφία (LC), ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος εξαρτάται από τη διαφορετική ταχύτητα μετακίνησης των συστατικών του δείγματος διαμέσου μιας στήλης και την μετατόπιση κατά μήκος της στήλης των μορίων της κάθε ουσίας. Στο Σχήμα 5.1, το συστατικό (1) κινείται πιο γρήγορα και εκλούεται πρώτο από τη στήλη, το



Σχήμα 5.1. Υποθετικός διαχωρισμός δείγματος αποτελουμένου από τρία επιμέρους συστατικά.

συστατικό (3) κινείται πιο αργά και εκλούεται από τη στήλη τελευταίο. Σαν αποτέλεσμα, τα συστατικά (1) και (3) σταδιακά διαχωρίζονται καθώς κινούνται κατά μήκος της στήλης. Το δεύτερο χαρακτηριστικό ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού, είναι η διεύρυνση της ζώνης των μορίων κατά μήκος της στήλης. Όπως στο σχήμα 5.1, το δείγμα απεικονίζεται σαν μια στενή ζώνη στην κορυφή της στήλης μέχρι τα μόρια να απλωθούν σε πολύ ευρύτερη ζώνη της στήλης. Η μέση ταχύτητα μετακίνησης του κάθε μορίου μιας συγκεχριμένης ουσίας δεν είναι σταθερή, λόγω διαφόρων φαινομένων. Τα σημαντικότερα από αυτά είναι:

1. Διάχυση Eddy: Η ροή πολλαπλών οδών, προκύπτει από τις διαφορετικές διόδους που ακολουθεί ο διαλύτης ανάμεσα στα σωματίδια της στατικής φάσης της στήλης. Σαν αποτέλεσμα, τα μόρια του δείγματος ακολουθούν διαφορετικές διαδρομές διαμέσου του διευθετημένου στρώματος, που εξαρτώνται από το ποια δίοδο ακολουθούν. Αφού το υγρό μετακινείται γρηγορότερα σε διόδους με ευρύτερη διάμετρο απ' ότι σε στενότερες, τα μόρια που ακολουθούν τις ευρύτερες διόδους μονοπάτια κινούνται γρηγορότερα κατά μήκος της στήλης με τη μεγαλύτερη ταχύτητα του διαλύτη, απ' ότι τα μόρια που ακολουθούν τις στενές διαδρομές. Σαν αποτέλεσμα, τα μόρια διασπείρονται από μια αρχική στενή ζώνη σε μια ευρεία ζώνη της στήλης και η διασπορά προοδευτικά μεγαλώνει όσο η ροή του διαλύτη μέσω της στήλης συνεχίζεται.
2. Μεταφορά μάζας: Φαινόμενα μεταφοράς μάζας, μπορούν για ευκολία να χωριστούν σε μεταφορά μάζας της στατικής φάσης και κινητής φάσης. Η μεταφορά μάζας κινητής

φάσης μπορεί περαιτέρω να διαιρεθεί σε “κινούμενης” κινητής φάσης και “στάσιμης” κινητής φάσης, αντίστοιχα.

- (i) Μεταφορά μάζας στατικής φάσης: Ο ρυθμός με τον οποίο τα μόρια της διαλυμένης ουσίας μετακινούνται από και προς την στατική φάση, έχουν σημαντική συνεισφορά στη διεύρυνση της ταινίας και συνεπώς στην ευαισθησία των μεθόδων. Διότι αν ένα μόριο διεισδύει βαθειά στη στατική φάση, περνάει μεγαλύτερο χρόνο μέσα στο σώμα της φάσης και καθυστερή η έκλουσή του από τη στήλη. Αντίθετα, το μόριο που παραμένει μικρότερο χρόνο στη στατική φάση επιστρέφει στην κινητή φάση νωρίτερα και εκλούεται γρηγορότερα από την στήλη.
 - (ii) Μεταφορά μάζας κινούμενης κινητής φάσης: Μόρια στην ίδια φλέβα ροής δεν κινούνται όλα με την ίδια ταχύτητα. Τα μόρια που γειτονεύουν την επιφάνεια των σωματιδίων θα κινηθούν πιο αργά απ'ότι αυτά στο μέσον, και έτσι σχηματίζεται ένα “προφίλ” ροής κατά μήκος της στήλης και το εύρος της ταινίας αυξάνεται.
 - (iii) Μεταφορά μάζας “στάσιμης” κινητής φάσης: ‘Όταν χρησιμοποιούνται πορώδη υλικά πληρώσεως για τη στατική φάση, η κινητή φάση που περιέχεται μέσα στους πόρους των τεμαχιδίων είναι στάσιμη. Τα μόρια της διαλυμένης ουσίας πρέπει να διαχυθούν μέσω αυτής της στάσιμης κινητής φάσης για να φτάσουν την στατική φάση. Μόρια που διαχέονται για μικρή μόνο απόσταση μέσα στον πόρο, σύντομα επανέρχονται στο κύριο ρεύμα, ενώ, μόρια που διαχέονται περισσότερο και για μεγαλύτερο χρόνο, θα μείνουν πίσω στο κύριο ρεύμα, με αποτέλεσμα τη διεύρυνση της χρωματογραφικής ταινίας.
3. Κατά πλάτος διάχυση: Είτε η κινητή φάση βρίσκεται σε κίνηση μέσα στην στήλη είτε σε ηρεμία, τα μόρια του δείγματος τείνουν να διαχυθούν τυχαία προς όλες τις διευθύνσεις. Αυτό προκαλεί περαιτέρω κατά πλάτος εξάπλωση των μορίων του δείγματος εντός της στήλης. Η κατά πλάτος διάχυση συχνά δεν είναι σημαντική, παρά μόνο σε χαμηλές ταχύτητες ροής της κινητής φάσης για μικρά τεμαχίδια υλικού πληρώσεως της στήλης.

Τελικά, τα διάφορα συστατικά φτάνουν το άκρο της στήλης και μεταφέρονται στον ανιχνευτή, όπου οι συγκεντρώσεις τους καταγράφονται συναρτήσει του χρόνου κατακράτησης και η καταγραφή ονομάζεται χρωματογράφημα. Ένα χρωματογράφημα μπορεί να χαρακτηριστεί από τέσσερα στοιχεία που είναι σημαντικά στην περιγραφή του διαχωρισμού:

1. Κάθε συστατικό εγκαταλείπει την στήλη στη μορφή συμμετρικής, καλοσχηματισμένης κορυφής.
2. Κάθε ταινία εξέρχεται από τη στήλη σε χαρακτηριστικό χρόνο, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση του συστατικού. Ο χρόνος καλείται χρόνος κατακράτησης (t_R). Μετράται από τη στιγμή της έγχυσης του δείγματος ως τη στιγμή της εμφανίσεως του μεγίστου της ταινίας.

3. Το τρίτο χαρακτηριστικό στοιχείο είναι η διαφορά των χρόνων καταχράτησης μεταξύ δύο ταινιών. 'Όσο μεγαλύτερη είναι, τόσο ευκολότερος ο διαχωρισμός των δύο κορυφών.
4. Τελικά, κάθε κορυφή χαρακτηρίζεται από το εύρος της. 'Όσο στενότερη είναι τόσο καλύτερος ο διαχωρισμός.

5.2.1 Διάφορες Υγρές Χρωματογραφικές μέθοδοι

Διαφορετικοί μηχανισμοί ή διεργασίες λαμβάνουν χώρα για την καταχράτηση των μορίων του δείγματος από την στατική φάση. Αυτοί αποτελούν τη βάση διαφόρων τεχνικών ανάλυσης με υγρή χρωματογραφία. Παρακάτω δίνεται μια σύντομη περιγραφή των συγκεκριμένων μεθόδων:

5.2.1.1 Υγρή-Υγρή ή Χρωματογραφία Κατανομής

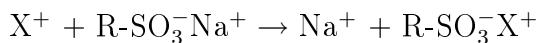
Αυτή αναπτύχθηκε από τους Martin και Synge το 1941 [95]. Περιλαμβάνει μια υγρή δυσδιάλυτη στατική φάση, που εμποτίζει ένα λεπτότατα καταμερισμένο αδρανές υλικό στήριξης με το οποίο είναι φυσικά και χημικά δεμένη. Η υγρή κινητή φάση έχει τελείως διαφορετική χημική σύνθεση από τη στατική φάση. Το προς ανάλυση δείγμα διαλύεται στην κινητή φάση και κατανέμεται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης, αναλόγως του συντελεστή κατανομής K. Αυτή η κατανομή οδηγεί σε διαφορετικούς ρυθμούς μετακίνησης των υπό ανάλυση - διαχωρισμό μορίων, οπότε προκύπτει διαχωρισμός [100].

5.2.1.2 Υγρή-Στερεή ή Χρωματογραφία Προσροφήσεως

Είναι η παλαιότερη από τις υγρές χρωματογραφικές μεθόδους και αναπτύχθηκε από τον Tswett το 1906 και ακολούθως από τους Kahn και Lederer το 1931 [97]. Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας εισήχθη στις αρχές της δεκαετίας του 1950 από τον Kirchner και αργότερα διαδόθηκε από τον Stahl. Νέες μορφές υγρής - στερεής χρωματογραφίας με αυτοματοποιημένη γρήγορη και μεγάλης διαχωριστικής ικανότητας οργανολογία, χρονολογούνται από το 1967 [98]. Ο διαχωρισμός διεξάγεται με συνδυασμό υγρής κινητής φάσης και στερεής στατικής φάσης που προσροφά και εκροφά τα μόρια της διαλυμένης ουσίας. Η στατική φάση είναι πολική (π.χ. Silica gel, πορώδη υάλινα στρώματα ή αλούμινα) και η κινητή φάση μη πολική (π.χ. εξάνιο, πεντάνιο, χλωροφόριο).

5.2.1.3 Χρωματογραφία Ιονοανταλλαγής

Αυτή η μέθοδος διαχωρισμού αναπτύχθηκε από τον Samuelson το 1963 [99]. Περιλαμβάνει την αντικατάσταση ενός ιόντος από ένα άλλο. Η στατική φάση περιέχει καθηλωμένες ιοντικές ομάδες, όπως $-SO_3^-$ καθώς και ιόντα αντιθέτου φορτίου (π.χ. Na^+). Αυτά είναι επίσης παρόντα στην κινητή φάση με μορφή άλατος (π.χ. NaCl). Ο πιο κοινός μηχανισμός κατακράτησης είναι με απλή ανταλλαγή ιόντων:



5.2.1.4 Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού

Η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού ή διαπερατότητας πηκτής (gel filtration or gel permeation) βρίσκεται ευρεία εφαρμογή στον καθαρισμό φυτικών εκχυλισμάτων. Η αρχή της στηρίζεται στη διαφορετική ικανότητα των μορίων να διεισδύουν στους πόρους της πηκτής. Τα μεγάλα μόρια δεν εισέρχονται στους πόρους και διέρχονται από τη στήλη της πηκτής άμεσα ενώ τα μικρότερα εισέρχονται στους πόρους αυτής, όπου και διαχέονται, με αποτέλεσμα να καθυστερεί η έκλουση τους. Με αυτό τον τρόπο λαμβάνει χώρα γενικά η έκλουση των μορίων διαφόρων ουσιών (από το προσροφητικό υλικό που έχει τη μορφή πηκτής) με σειρά μειωμένου μοριακού βάρους [99].

5.2.1.5 Χρωματογραφία Χάρτη

Η χρωματογραφία χάρτη, που αναπτύχθηκε από τους Consden Gordon και Martin [101, 102] το 1944, είναι είδος επίπεδης χρωματογραφίας στην οποία χρησιμοποιείται ταινία ή φύλλο χάρτη (κυτταρίνη) του οποίου ο ρόλος είναι διπλός: ως στατική φάση και ως στερεό υλικό στήριξης της στατικής φάσης. Έτσι, ο κύριος μηχανισμός διαχωρισμού των συστατικών ενός μίγματος είναι η κατανομή αυτών μεταξύ δύο υγρών: α) ενός πολικού, συνήθως νερού, προσροφημένου στο χάρτη (στατική φάση) και β) ενός λιγότερο πολικού, οργανικού διαλύτη, που κινείται μέσω τριχοειδών φαινομένων στο χάρτη (κινητή φάση). Μπορεί όμως να συμβεί σε μικρή κλίμακα και προσρόφηση, καθώς και ιονανταλλαγή. Στη χρωματογραφία χάρτη όπως και στα άλλα είδη επίπεδης χρωματογραφίας, συνήθως οι ζώνες των συστατικών δεν εκλούονται, αλλά η χρωματογράφηση διακόπτεται όταν το μέτωπο του διαλύτη βρίσκεται ακόμα στο χάρτη. Η κινητή φάση είναι συνήθως μίγμα οργανικών διαλυτών με νερό και μπορεί να είναι ουδέτερη, βασική ή όξινη.

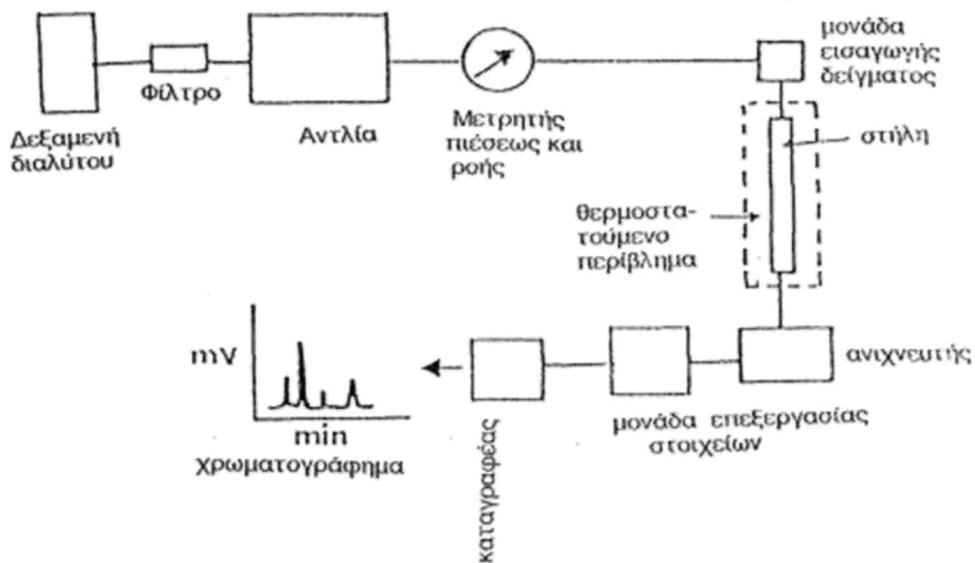
5.2.1.6 Υγρή Χρωματογραφιά Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Το 1941 οι Martin και Synge περιέγραψαν τις αρχές της υγρής-υγρής χρωματογραφίας κατανομής, και στην ίδια εργασία βρίσκονταν τα θεμέλια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Παρακάτω γίνεται λόγος για τις “θεωρητικές πλάκες”. Αυτή η παράμετρος έχει υιοθετηθεί σήμερα ως μέτρο της ικανότητας διαχωρισμού της στήλης. Επίσης φαίνεται ότι μπορεί να επιτευχθεί αυξημένη απόδοση της στήλης με τη χρήση τεμαχιδίων στατικής φάσης μικρότερου μεγέθους. Είναι, ωστόσο, παραδεκτό ότι η ανάπτυξη της HPLC άρχισε στη δεκαετία του 1960 [103] και μεταξύ 1967-1969. οι Kirkland [104], Huber [105] και Horvath, Presis και Lipeky [106], περιέγραψαν την πρώτη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης όπως τουλάχιστον χρησιμοποιείται σήμερα.

Η HPLC είναι μια μέθοδος ανάλογη της αερίου χρωματογραφίας όπου η στατική φάση αποτελείται από κάποια στερεή ή υγρή επιφάνεια υπό την μορφή πορώδους υλικού πακεταρισμένου σε μεταλλική στήλη όπου η υγρή κινητή φάση μετακινείται επειδή ασκείται πίεση.

Μία συσκευή HPLC απαιτεί μια αντλία ώθησης της κινητής φάσης, μία μονάδα παροχής της κινητής φάσης, μια στήλη πληρωθείσα με στατική φάση υψηλής απόδοσης ή καλύτερα υψηλών δυνατοτήτων, ένα σύστημα έγχυσης για την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη, έναν ανιχνευτή και ένα καταγραφέα για την καταγραφή του σήματος του ανιχνευτή. Η ροή των συστατικών του δείγματος και της κινητής φάσης, φαίνονται στο σχήμα 5.2. Όταν η στατική φάση είναι πιο πολική από την κινητή φάση, αυτή η μορφή της HPLC ονομάζεται κανονικής φάσεως χρωματογραφία. Σ' αυτήν την περίπτωση, η στατική φάση έχει προσροφητικές ιδιότητες. Συνήθη υλικά πληρώσεως της στήλης περιλαμβάνουν την silica και διάφορες πολικές δεσμευμένες φάσεις (κύανο-, διολο-, αμινο-). Στην HPLC κανονικής φάσης, οι αλληλεπιδράσεις διαλύτη-δείγματος είναι σχετικά ισχυρές [107]. Αυτή η μέθοδος HPLC χρησιμοποιείται συνήθως για τον διαχωρισμό συστατικών διαλυτών σε οργανικούς διαλύτες και για τον διαχωρισμό ισομερών. Η κινητή φάση συνίσταται από μη πολικούς διαλύτες, όπως εξάντο ή 1,1,2-τριφθορο,1,2,2-τριχλωροαιθάνιο (freon). Τροποποιητές, όπως μεθυλοχλωρίδιο, μεθυλο-t-βουτυλαιθέρας, προστίθενται συχνά.

Τα συστήματα HPLC αντιστρόφου φάσεως, εισήχθησαν από τους Howard και Martin [108] το 1950, χρησιμοποιώντας μη πολική στατική φάση, σε συνδυασμό με πολική κινητή φάση. Χαρακτηρίζεται από ισχυρές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην πολική κινητή φάση και τα μόρια του δείγματος. Αντίθετα, η αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων του δείγματος και της μη πολικής στατικής φάσης είναι ασθενής. Αυτό υποδεικνύει ότι οι αλληλεπιδράσεις, συνήθως, μεταξύ δείγματος και διαλύτη είναι αυτές που καθορίζουν τη σχετική κατακράτηση και τον διαχωρισμό στα συστήματα HPLC αντιστρόφου φάσεως [108]. Οι πιο συνηθισμένες αντίστροφες φάσεις είναι οι δεκαοκτυλο- (C_{18}), οκτυλο- (C_8), φαιναιθυλο- και κυανοπροπυλο- που είναι χημικά συνδεδεμένες με οξείδιο του πυριτίου. Η κινητή φάση, συνήθως συνίσταται από μεθανόλη, ακετονιτρίλιο ή τετραϋδροφουράνιο,



Σχήμα 5.2. Σχηματική παράσταση συσκευής υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης.

αναμειγμένα με νερό.

Πλεονεκτήματα της HPLC

Μερικά από τα πλεονεκτήματα είναι:

1. Οι στήλες της HPLC χρησιμοποιούνται πολλές φορές χωρίς την ανάγκη αναγέννησης,
2. Η διαχωριστική ικανότητα τέτοιων στηλών είναι πολύ μεγαλύτερη από τις κοινές ανοιχτές στήλες,
3. Ο χρόνος ανάλυσης είναι μικρότερος.
4. Η οργανολογία της HPLC αυτοματοποιείται εύκολα, επομένως είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί μεγάλος αριθμός ποσοτικών αναλύσεων.
5. Επειδή η όλη διαδικασία της ανάλυσης εξαρτάται από την οργανολογία και λιγότερο από την ικανότητα του χειριστού-αναλυτή η επαναληψιμότητα είναι καλύτερη,
6. Είναι δυνατή η ταυτόχρονη διεξαγωγή χρωματογραφικών αναλύσεων ουσιών διαφορετικής χημικής δομής.

5.2.2 Βασικές Παράμετροι της Υγρής Χρωματογραφίας

Υπάρχουν τέσσερις βασικές χρωματογραφικές παράμετροι οι οποίες είναι χρήσιμες στην αξιολόγηση της ποιότητας των χρωματογραφημάτων και στη διάγνωση των προβλημάτων, όταν προκύπτουν [99, 110, 111, 112, 113, 114, 115]:

1. παράγοντας χωρητικότητας (capacity factor)
2. παράγοντας διαχωρισμού (separation factor)
3. αριθμός θεωρητικών πλακών (column plate number)
4. παράγοντας ασυμμετρίας (asymmetry factor).

5.2.2.1 Παράγοντας Χωρητικότητας

Ο παράγοντας χωρητικότητας R' είναι πιο χρήσιμο μέτρο της καταχράτησης από το χρόνο καταχράτησης t_R επειδή ο χρόνος καταχράτησης μεταβάλλεται όταν το μήκος της στήλης ή η ταχύτητα ροής αλλάζουν. Αντίθετα το R' δεν μεταβάλλεται. Ο υπολογισμός του R' απαιτεί τη μέτρηση του νεκρού χρόνου της στήλης, t_0 , από το χρωματογράφημα. Ο νεκρός χρόνος της στήλης, t_0 , είναι ο χρόνος που απαιτείται για να περάσει οπό τη στήλη ένα μόριο που θεωρητικά δεν καταχρατείται, όπως αυτό το μόριο του διαλύτη. Ο νεκρός χρόνος μετρείται από τη στιγμή της εφαρμογής του δείγματος στη στήλη ως την εμφάνιση της πρωτιάς διαταραχής της βασικής γραμμής. Σε περιπτώσεις όπου το t_0 δεν είναι εμφανές στο χρωματογράφημα, μπορεί να καταστεί απαραίτητη η έγχυση μιας ουσίας που είναι γνωστό ότι δεν καταχρατείται, όπως η ουρακίλη, για την υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Ο παράγοντας R' δίνεται από τον τύπο:

$$R' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (5.1)$$

Ο παράγοντας χωρητικότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύγκριση της καταχράτησης σε διαχωρισμούς κατά τους οποίους το μήκος της στήλης ή ο ρυθμός ροής αλλάζουν. Ο παράγοντας χωρητικότητας μπορεί να μεταβάλλεται και να βρίσκεται υπό έλεγχο αλλάζοντας την ισχύ της κινητής φάσης. 'Ενας καλός εμπειρικός κανόνας για διαχωρισμούς αντιστρόφου φάσεως είναι ότι μια μεταβολή κατά 10% στην ισχύ της κινητής φάσης θα διπλασιάσει ή τριπλασιάσει την τιμή του R' . Άλλαζοντας το R' με ρύθμιση της ισχύος της κινητής φάσης, αλλάζει το t_R για όλες τις κορυφές σε ένα χρωματογράφημα. Μεγαλύτερα R' δίνουν ευρύτερες και χαμηλότερες κορυφές, R' με τιμή μεγαλύτερη του 1 και μικρότερη του 20 είναι επιθυμητό για τους περισσότερους διαχωρισμούς ενώσεων.

5.2.2.2 Παράγοντας Διαχωρισμού ή Εκλεκτικότητας

Ο παράγοντας διαχωρισμού ή εκλεκτικότητας, α , είναι ο λόγος των παραγόντων χωρητικότητας δύο κορυφών

$$\alpha = \frac{R'_B}{R'_A} \quad (5.2)$$

όπου R'_A και R'_B είναι οι παράγοντες χωρητικότητας των κορυφών που μας ενδιαφέρουν. 'Όπως ο R' έτσι και ο α είναι συνάρτηση του είδους της κινητής και της στατικής φάσης. Μπορεί να μεταβάλλεται αλλάζοντας τον τύπο της στήλης, για παράδειγμα από C_{18} σε φαινυλαιθυλο-στατική φάση. Η αλλαγή σύστασης της κινητής φάσης θα επηρεάσει επίσης το α , για παράδειγμα, αντικατάσταση τετραϋδροφουρανίου με ακετονιτρίλιο. Αυτές οι αλλαγές μπορούν συχνά να βοηθήσουν στο διαχωρισμό δύο ουσιών που χαρακτηρίζονται από σχεδόν ίδιους χρόνους καταχράτησης.

5.2.2.3 Αριθμός θεωρητικών Πλακών

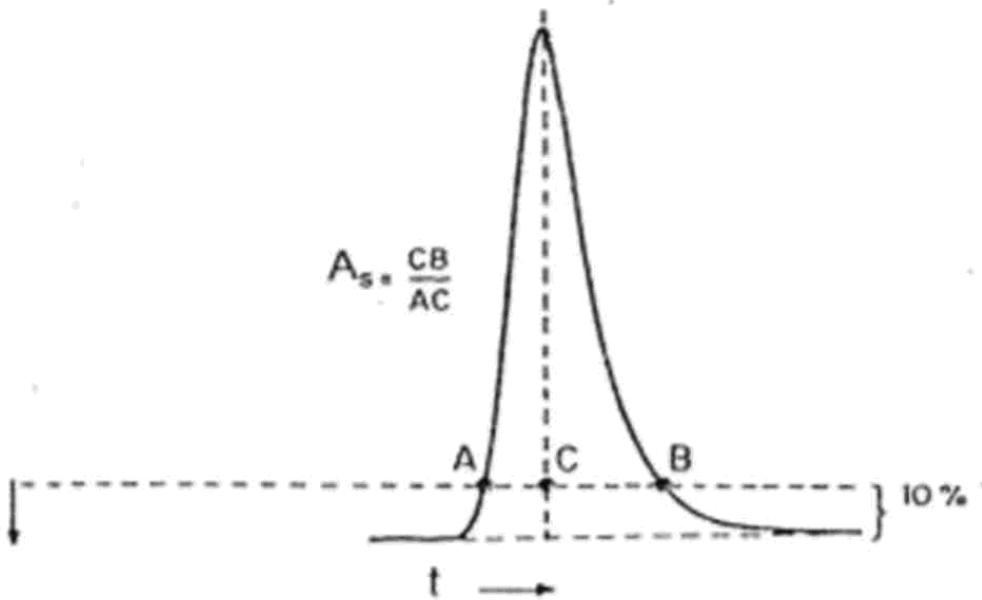
Ο αριθμός θεωρητικών πλακών, N , είναι μέτρο του εύρους των κορυφών. Το N συνήθως υπολογίζεται για να επιβεβαιώσει αν μια στήλη πληρεί τις προδιαγραφές του κατασκευαστή ή να επιβεβαιώσει την κατάσταση της στήλης μετά από επανειλημμένες αναλύσεις. Η μέτρηση του N γίνεται πιο εύκολα με την εξίσωση:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_{0.5}} \right)^2 \quad (5.3)$$

όπου t_R είναι ο χρόνος καταχράτησης και $W_{0.5}$ το εύρος της κορυφής στο ήμισυ του ύψους της. Στήλες με μεγάλες τιμές N δίνουν στενότερες κορυφές και γενικά καλύτερους διαχωρισμούς. Η διάμετρος των τεμαχιδίων της στατικής φάσης είναι αντιστρόφως ανάλογη του N . 'Έτσι αλλάζοντας από μία στήλη πληρωθείσα με τεμαχίδια 10 μμ, σε μία με 5 μμ διπλασιάζεται η τιμή του N (όταν οι άλλοι παράγοντες δεν μεταβάλλονται). Αύξηση του μήκους της στήλης αυξάνει την τιμή του N ανάλογα με το μήκος. Επίσης αυξάνει η διαφορά πίεσης κατά μήκος της στήλης. Αύξηση του ιξώδους της κινητής φάσης αυξάνει επίσης τη διαφορά πίεσης του συστήματος και ελαττώνει τον συντελεστή διάχυσης για τα συστατικά του δείγματος. Ακόμη προκαλεί μείωση του αριθμού πλακών της στήλης.

5.2.2.4 Παράγοντας Ασυμμετρίας

Ο παράγοντας ασυμμετρίας A_s είναι το ποσοτικό μέτρο του σχηματισμού "ουράς" των χρωματογραφικών κορυφών. Για τον υπολογισμό του A_s , χαράσσεται μία κάθετος μεταξύ του μέγιστου της κορυφής ως τη βασική γραμμή. Στο 10% του ύψους της κορυφής,



Σχήμα 5.3. Τρόπος υπολογισμού του παράγοντα ασυμμετρίας χρωματογραφικής κορυφής.

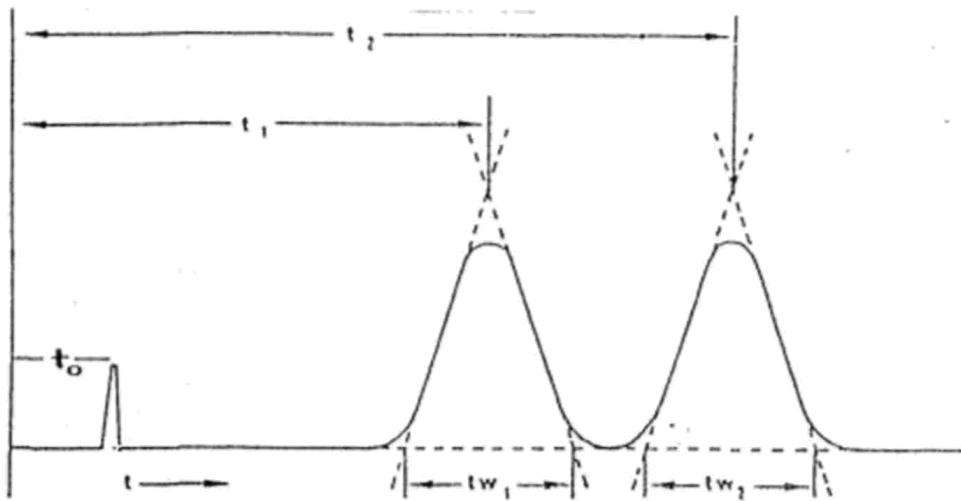
χαράσουμε την ευθεία AB (σχήμα 5.3). Διαιρώντας τα μήκη AC και CB τα μεταξύ τους καθορίζεται το A_s της κορυφής. Γενικά, οι τιμές του A_s μεταξύ των τιμών 0,9 και 1,2 είναι οι βέλτιστες για την καλύτερη απόδοση της στήλης. Στο σχήμα 5.3 δίνονται η σχηματική παράσταση και ο μαθηματικός τύπος του παράγοντα ασυμμετρίας.

5.2.2.5 Διαχωριστική Ικανότητα (Resolution)

Είναι ένα ποσοτικό μέτρο του σχετικού διαχωρισμού δύο διαδοχικών χρωματογραφικών κορυφών και ισούται με την απόσταση μεταξύ των μέσων των δύο κορυφών, διαιρεμένη με το μέσο εύρος των κορυφών (βλ. σχήμα 5.4):

$$R_s = \frac{t_2 - t_1}{\frac{1}{2}(t_{w1} + t_{w2})} \quad (5.4)$$

Οι τιμές t_1 , και t_2 αναφέρονται στο χρόνο καταχράτησης των ταινιών του σχήματος, και t_{w1} και t_{w2} είναι οι τιμές του εύρους των κορυφών. Όταν το R_s είναι ίσο με 1 οι δύο ταινίες διαχωρίζονται ικανοποιητικά, δηλαδή μόνο το 2% της μιας ταινίας καλύπτεται από την άλλη. Μεγαλύτερες τιμές R_s , αντικατοπτρίζουν καλύτερο διαχωρισμό, ενώ μικρότερες τιμές δείχνουν φτωχό διαχωρισμό. Το κρίσιμο σημείο ενός διαχωρισμού υγρής χρωματογραφίας είναι εάν οι κορυφές που μας ενδιαφέρουν διαχωρίζονται ικανοποιητικά από άλλες ή όχι. Παρόλο που εμπειρικά και μόνο στο χρωματογράφημα συνήθως φαίνεται αν ο διαχωρισμός



Σχήμα 5.4. Διαχωρισμός δυο ουσιών με $R_s > 1,5$.

είναι επαρκής, είναι γενικά επιθυμητό, το κοίλο τμήμα μεταξύ των ταινιών να επιστρέψει στη βασική γραμμή.

Η κατανόηση του ρόλου του R' , α και N στη διαχωριστική ικανότητα της στήλης είναι αναγκαία για τη συστηματική βελτίωση φτωχών διαχωρισμών χρωματογραφικών κορυφών. Γι' αυτό, η χρήση της θεμελιώδους εξίσωσης στην υγρή χρωματογραφία που μας επιτρέπει να ελέγξουμε τη διαχωριστική ικανότητα αλλάζοντας τα α , N ή R' , θα μπορούσε να εκφραστεί ως εξής:

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \sqrt{N} \frac{R'_A}{1 + R'_B} \quad (5.5)$$

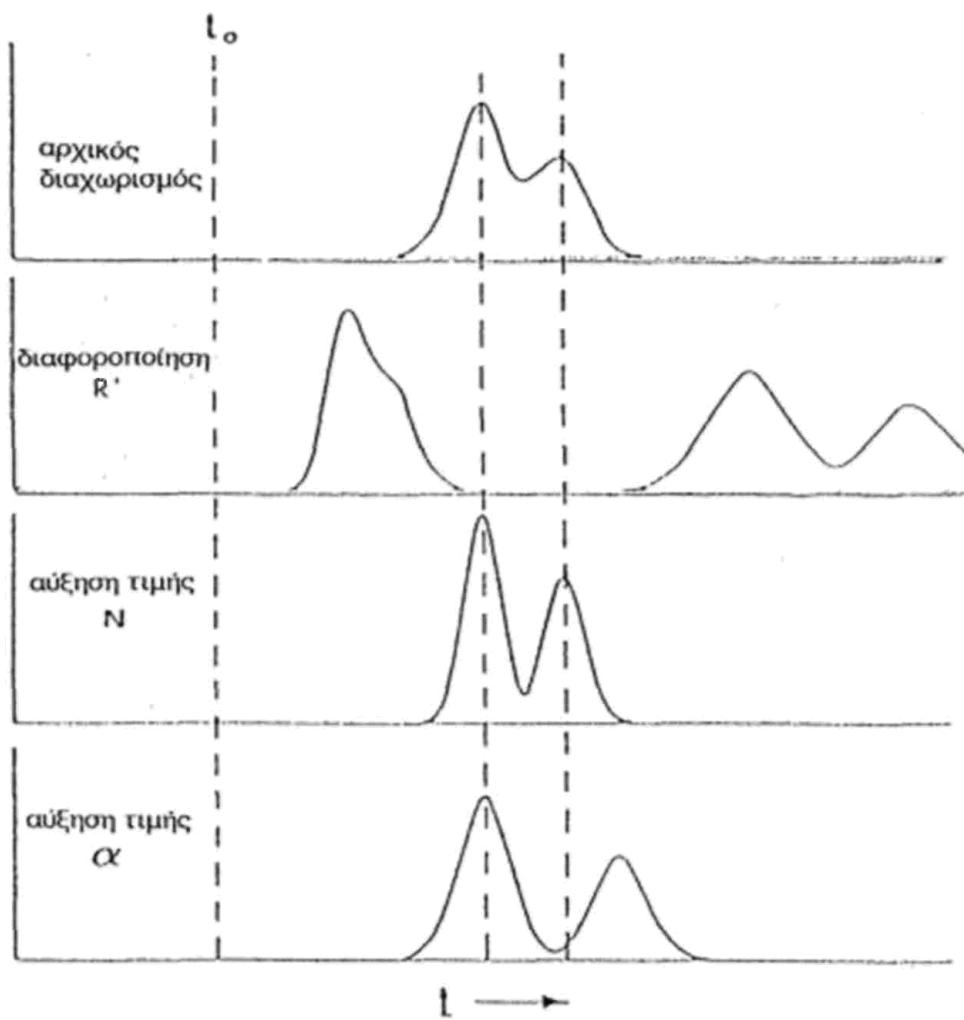
Οι τρείς όροι, α , N , R' , είναι σχεδόν ανεξάρτητοι και μπορούν να μεταβληθούν χωριστά στον έλεγχο ενός διαχωρισμού. Η εκλεκτικότητα ενός διαχωρισμού, εκφρασμένη ως παράγοντας διαχωρισμού, α , (όρος $\alpha-1$ της εξίσωσης) μεταβάλλεται αλλάζοντας τη σύσταση της κινητής και στατικής φάσης [116]. Η ικανότητα διαχωρισμού όπως εκφράζεται από τον αριθμό θεωρητικών πλακών (N) μεταβάλλεται αλλάζοντας το μήκος της στήλης ή την ταχύτητα ροής του διαλύτη ή αλλάζοντας το υλικό πληρώσεως της στήλης. Ο όρος $1 + R'_B$ που περιλαμβάνει τον παράγοντα χωρητικότητας R' μεταβάλλεται αλλάζοντας την ισχύ του διαλύτη, δηλαδή την ικανότητα της κινητής φάσης να δίνει μεγάλες ή μικρές τιμές R'_B για ένα δεδομένο μίγμα ενώσεων. Άλλαγές στις τιμές των παραμέτρων N , R'_B και α μπορούν να βελτιώσουν την τιμή R_s . Για παράδειγμα αύξηση του αριθμού πλακών N καταλήγει σε λήψη στενότερων χρωματογραφικών κορυφών, αύξηση του ύψους των ταινιών και του R_s . Ωστόσο απαιτείται τετραπλασιασμός της τιμής του N για να διπλασιαστεί το R_s γιατί εξαρτάται από την τετραγωνική ρίζα του N . Μείωση της ταχύτητας ροής θα προκαλέσει αύξηση της τιμής του N μιας στήλης με τεμαχίδια 10μ ή μεγαλύτερα, αλλά στην πράξη συνήθως δεν επιφέρει αισθητά αποτελέσματα στις στήλες που χρησιμοποιούνται σήμερα μεγέθους τεμαχιδίων 3 και

5μ. Η χρήση διπλών στηλών ή η αντικατάσταση μιας ήδη μεταχειρισμένης στήλης από μια καινούρια θα επιφέρει επαρκή αύξηση στο N και συνεπώς στο R_s . Γενικά η αύξηση της τιμής του N δεν είναι η καλύτερη προσέγγιση στο πρόβλημα της αύξησης του R_s γιατί μπορεί να αυξήσει το χρόνο διαχωρισμού των υπό ανάλυση ουσιών.

Αύξηση του παράγοντα διαχωρισμού, α , οδηγεί σε σημαντική αύξηση του R_s . Αλλάζοντας τον αρχικό διαλύτη στην κινητή φάση μεταβάλλουμε εύκολα το α . Για παράδειγμα, αντικατάσταση μεθανόλης με ακετονιτρίλιο στην αντιστρόφου φάσεως HPLC ή του μεθυλοχλωριδίου από t-βουτυλομεθυλαιθέρα στην HPLC κανονικής φάσεως, συνήθως αλλάζουν οι τιμές του α .

Η βέλτιστη περιοχή για το R'_B είναι $1 < R'_B < 20$. Μεγαλύτερες τιμές από το 20 πολύ λίγο μεταβάλλουν το R_s , στην πραγματικότητα αυξάνουν το χρόνο ανάλυσης, το εύρος της ταινίας, ενώ μειώνουν το ύψος της κορυφής. 'Όταν το R_s πρέπει να αυξηθεί, και το R' για τον αρχικό διαχωρισμό είναι μικρό, τότε πρέπει να αυξηθεί σ' αυτή τη βέλτιστη περιοχή. Αυτό γιατί, η ρύθμιση του R'_B είναι ο ευκολότερος και πιο εύχρηστος τρόπος για την αύξηση της τιμής του R_s αν είναι ανεπαρκής. Αλλά αν το R'_B είναι ήδη εντός της βέλτιστης περιοχής και το R_s εξακολουθεί να είναι οριακό, η καλύτερη λύση είναι συνήθως αύξηση του N , όχι όμως με αλλαγή του υλικού πληρώσεως της στήλης. Οι τιμές του R'_B ελέγχονται μέσω της ισχύος του διαλύτη κατά τέτοιο τρόπο, ώστε αλλαγή κατά 10% στην ισχύ του διαλύτη διπλασιάζει ή τριπλασιάζει το R'_B . 'Όταν η τιμή του R'_B πρέπει να αυξηθεί, επιλέγεται ασθενέστερος διαλύτης ως προς την εκλουστική ισχύ ενώ όταν το R'_B πρέπει να μειωθεί χρησιμοποιείται ισχυρότερος.

'Όταν η τιμή του R_s είναι μεγαλύτερη του αναγκαίου, συχνά μπορεί να μειωθεί για να ελαττωθεί ο χρόνος αναλύσεως. Ο συνήθης τρόπος για τη μείωση του R_s είναι η μείωση του N , ελαττώνοντας το μήκος της στήλης. Σε μια τέτοια περίπτωση αύξηση της ροής του διαλύτη θα μειώσει το χρόνο ανάλυσης, όμως σε περίπτωση που χρησιμοποιούνται στήλες μεγέθους τεμαχιδίων 5 μμ ή και μικρότερου η τιμή του R_s ελάχιστα μεταβάλλεται.



Σχήμα 5.5. Επίδραση των παραμέτρων R' , N και α στο διαχωρισμό δύο συστατικών δείγματος.

Μέρος II

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 6

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

6.1 Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα ήταν αναλυτικής καθαρότητας και δεν έγινε περαιτέρω επεξεργασία τους. Το κατιοντικό επιφανειοδραστικό DDAB ήταν προϊόν της εταιρίας Aldrich. Τα διαλύματα εργασίας $5 \cdot 10^{-2}$ M DDAB ετοιμαζόταν σε εβδομαδιαία βάση με δις αποσταγμένο ύδωρ. Για την ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τα προστατευτικά έναντι του ηλίου παρασκευάσματα Eusolex 232 (2-phenylbenzimidazol-5-sulfonic acid sodium salt), Bz-3 (2-hydroxy-4-methoxybenzophenone), Eusolex 6300 (3-(4-methylbenzyldene)- camphor) και Eusolex 2292 (octyl methoxy cinnnamate) (πίνακας 6.1), τα οποία προμηθευτήκαμε από τη Merck. Τα πρότυπα διαλύματα των 100mg/L ετοιμαζόταν εβδομαδιαίως σε μεθανόλη (ή ύδωρ στην περίπτωση του E232) και αποθηκευόταν σε σκοτεινό μέρος στους 4°C. Οι δείκτες Alizarin Red S, Orange II και Thymol Blue ήταν προϊόντα της εταιρίας Fluka. Τα διαλύματα εργασίας ετοιμαζόταν καθημερινά με κατάλληλη αραίωση σε δις αποσταγμένο νερό. Το ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας $60 \cdot 10^{-3}$ M HEPES (4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid) με pH 8,2 ετοιμαζόταν με διαλυτοποίηση σε δις αποσταγμένο νερό. Το HEPES ήταν προϊόν της εταιρίας Fluka. Τους διαλύτες ακετονιτρίλιο, μεθανόλη και νερό για το χρωματογραφικό διαχωρισμό (HPLC-grade) τους προμηθευτήκαμε από την εταιρία Labscan. Η λεπτόχοκκη άμορφη μικροκρυσταλλική πυριτία ήταν προϊόν της Sigma, και είχε τις εξής φυσικές ιδιότητες: κατανομή μεγέθους σωματιδίων 0,5-10μm, με περίπου 80% ανάμεσα σε 1 και 5 μm και μέσο όρο 2,5 μm, επιφάνεια 220 m²/g και πυκνότητα 0,144 g/cm³. Τέλος, χωρίς περαιτέρω χημική επεξεργασία, χρησιμοποιήθηκαν τα επιφανειοδραστικά Sodium dodecylsulfate (SDS, Sigma), Triton X-114 (Aldrich) και cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, Fluka) και τα άλατα NaNO₃ (Fluka), KCl (Mallinckrodt), NaBr (Fluka) και NaCl (Merck). Όλα υψηλής καθαρότητας, >99%.

Πίνακας 6.1. Φυσικοχημικές ιδιότητες των μελετημένων οργανικών ενώσεων.

Εμπορική Όνομασία 'Ενωσης	Χημική Δομή	Μοριακό Βάρος	Διαλυτότητα στο ύδωρ *	Log K _{ow} *
Eusolex-232		274,29	2,363·10 ⁴	-0,16
Benzophenone-3		228,25	68,56	3,52
Eusolex-6300		240,35	0,573	5,47
Eusolex-2292		290,41	0,155	5,80
Alizarin-S		342.26	6,796·10 ⁴	-1,78
Orange II		350,33	2872	0,56
Thymol Blue		466,60	0,003	7,21

* Οι τιμές είναι υπολογισμένες με το λογισμικό EPI Suite v3.12

6.2 Όργανα

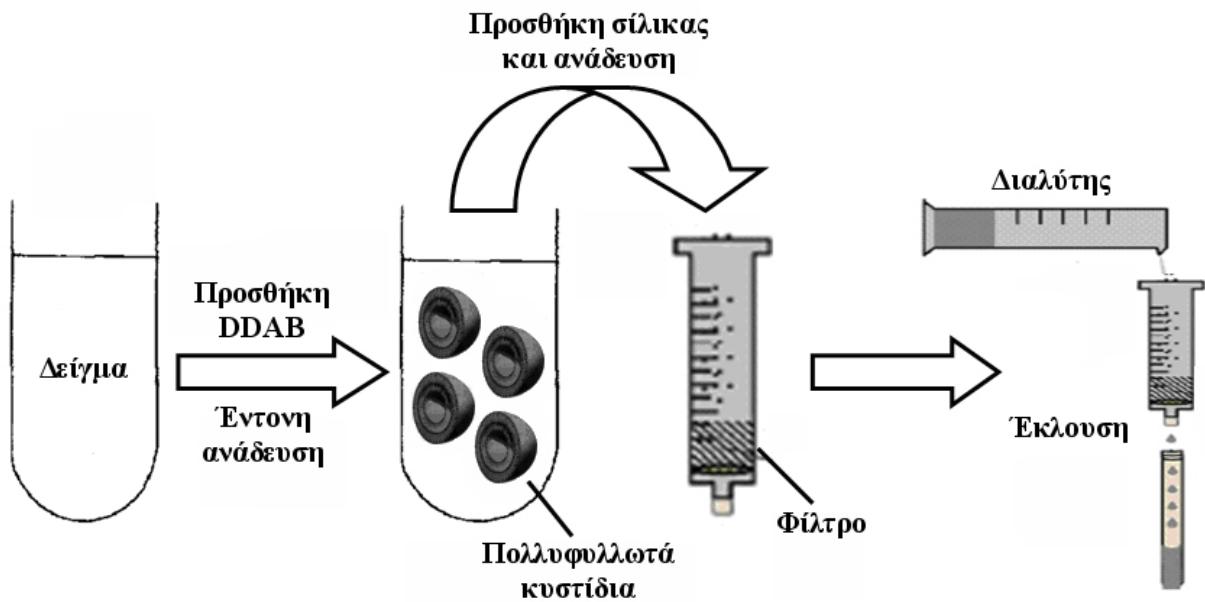
Οι αναλύτες διαχωρίστηκαν με ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας αποτελούμενο από έναν απαερωτή Shimadzu DGU-14A σε σύνδεση με ένα ρυθμιστή αναλογίας διαλυτών FCV-10AL και μια αντλία υψηλής πίεσης LC-10AD, μαζί με ένα βρόγχο εισαγωγής δείγματος 20 μL. Ο ανιχνευτής ήταν συστοιχίας διόδων υπεριώδους-ορατού SPD-M6A, ο οποίος λειτουργούσε μέσω του λογισμικού Class M10A (έκδοση 1.20). Το υλικό της χρωματογραφικής στήλης ήταν APEX C₁₈ (Jones Chromatography, UK), μεγέθους σωματιδίων 5 μm, (25 cm x 4,6 mm I.D). Η έκλουση των αναλυτών από τη στήλη ήταν ισοχρατική και η κινητή φάση αποτελούνταν από μίγμα ακετονιτριλίου/νερου (80/20 %v/v). Η θερμοκρασία της στήλης τέθηκε στους 30°C και η συλλογή των φασματικών δεδομένων γινόταν με ρυθμό ενός φάσματος ανά δευτερόλεπτο. Οι κορυφές του χρωματογραφήματος ταυτοποιήθηκαν τόσο από το χρόνο καταχράτησής τους, όσο και από το φάσμα τους. Οι μετρήσεις θολερότητας πραγματοποιήθηκαν στα 300 nm με ένα φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού Jenway 6402. Οι υπέρυθρες εξετάσεις πραγματοποιήθηκαν με ένα φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer FT-IR SPECTRUM GX, χρησιμοποιώντας την τεχνική της παστίλιας KBr. Ένα υδρόλουτρο με θερμοστάτη, διατηρημένο στις επιθυμητές θερμοκρασίες χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις επίδρασης θερμοκρασίας. Το pH των διαλυμάτων μετρήθημε με ψηφιακό πεχάμετρο Radiometer Copenhagen τύπου PHM83 με διακριτική ικανότητα 0,01 pH στην περιοχή 2-10.

6.3 Διασπορά στερεής φάσης κυστιδών προσρόφησης (ad-vesicle solid phase dispresion – ASPD)

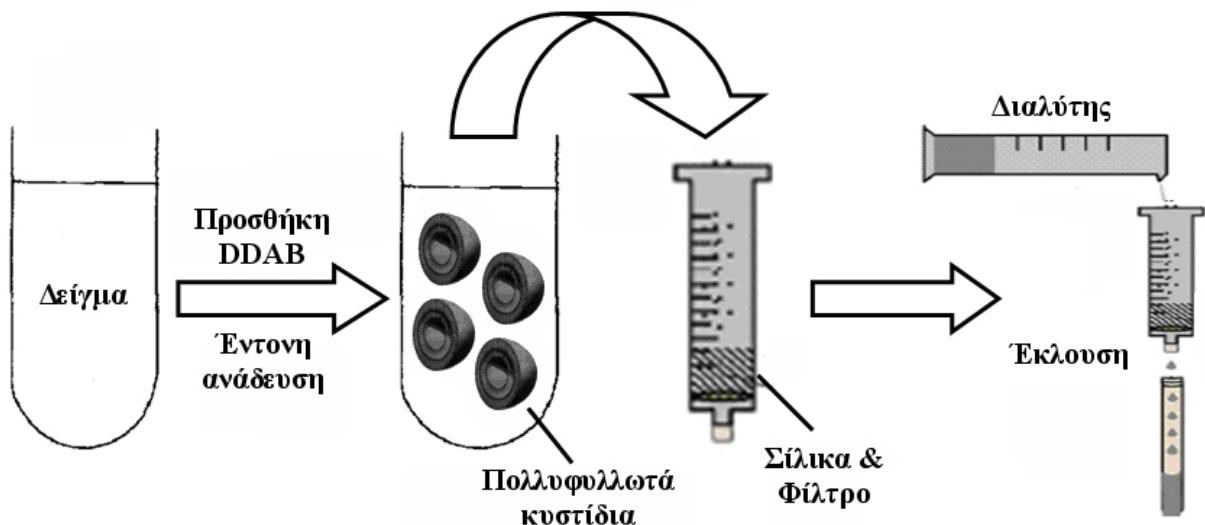
Σε 250mL ρυθμιστικού υδατικού διαλύματος Hepes (pH=8,2, C > 10 mM, 20°C) που περιείχε τους αναλύτες και 0.2 M NaBr, προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος DDAB μέχρι τελικής συγκέντρωσης $7 \cdot 10^{-4}$ M. Το μίγμα αναδεύτηκε έντονα (vortex) για 3 λεπτά ώστε να σχηματιστούν οι κυστοειδείς δομές του επιφανειοδραστικού, εγκλοβίζοντας τους αναλύτες. Ακολούθησε προσθήκη 50 mg ξηρής πυριτίας. Τα φιαλίδια αναδεύτηκαν ξανά (vortex) για 3-4 λεπτά ώστε να υπάρξει ομοιογενής διασπορά της πυριτίας και να προσροφηθούν τα κυστίδια (μαζί με τους αναλύτες) στην αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια της. Το μίγμα έπειτα διηγήθηκε ώστε να συλλέξουμε το στερεό. Η έκλουση πραγματοποιήθηκε με 0,5 mL μεθανόλης υψηλής καθαρότητας. Το τελικό εκχύλισμα πέρασε στη χρωματογραφική στήλη μέσα από βρόγχο εισαγωγής 20 μL και το χρωματογράφημα ελήφθει στον H/Y. Μια συνοπτική σχηματική παράσταση της πειραματικής πορείας φαίνεται στο σχήμα 6.1.

6.4 Εκχύλιση στερεής φάσης κυστιδίων προσρόφησης (ad-vesicle solid phase extraction – ASPE)

Πειράματα εκχύλισης στερεής φάσης πραγματοποιήθηκαν με 50 mg πυριτίας ενσωματωμένα σε cartridge 3 mL (J.T. Baker, USA). Η πυριτία εγκλιματίστηκε με διπλά αποσταγμένο νερό και μερικά χιλιοστόλιτρα ρυθμιστικού διαλύματος (HEPES, pH=8,2), ώστε να ενεργοποιηθεί η επιφάνεια της πυριτίας. Κατόπιν, 50 mL υδατικού διαλύματος διηθήθηκαν υπό κενό με ροή 10 mL/min. Η έκλουση των αναλύτων πραγματοποιήθηκε με 500μL μεθανόλης (σχήμα 6.2).



Σχήμα 6.1. Συνοπτικό σχεδιάγραμμα πορείας εργασίας με τη μέθοδο διασποράς στερεής φάσης κυστιδίων προσρόφησης (ASPD).



Σχήμα 6.2. Συνοπτικό σχεδιάγραμμα πορείας εργασίας με τη μέθοδο εκχύλισης στερεής φάσης κυστιδίων προσρόφησης (ASPE).

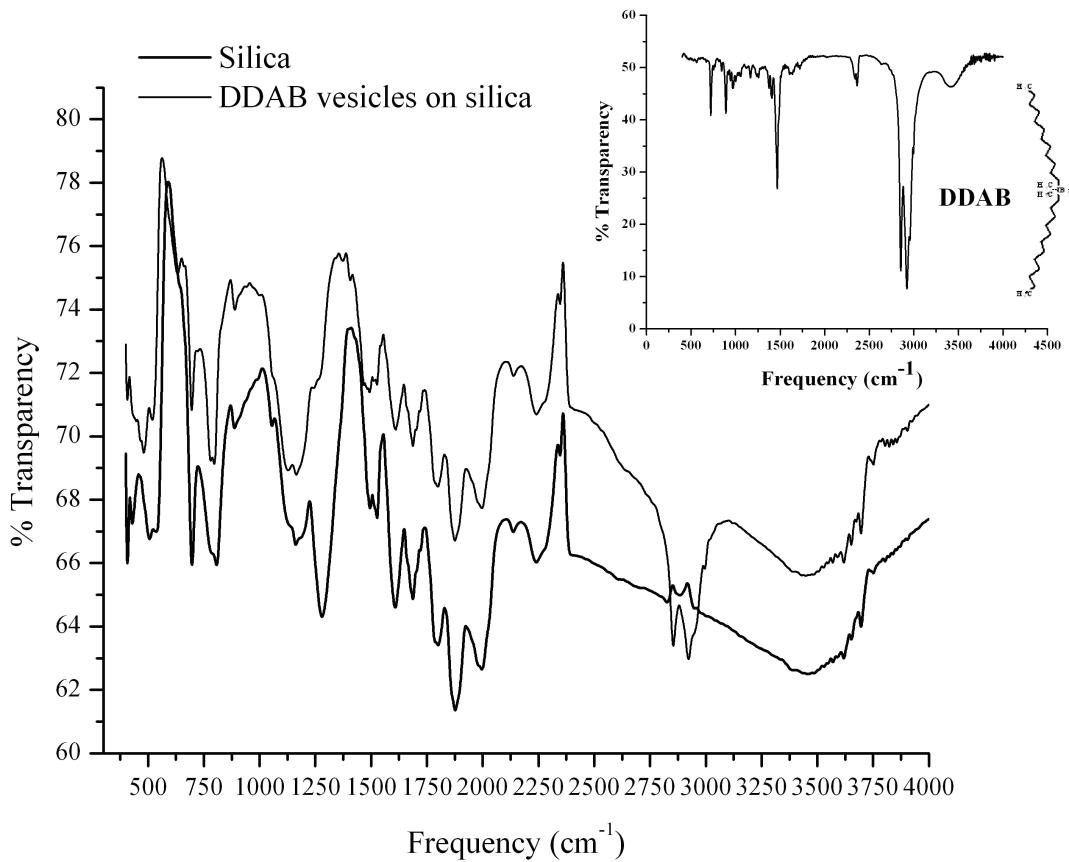
Κεφάλαιο 7

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 Προσρόφηση επιφανειοδραστικού στη πυριτία

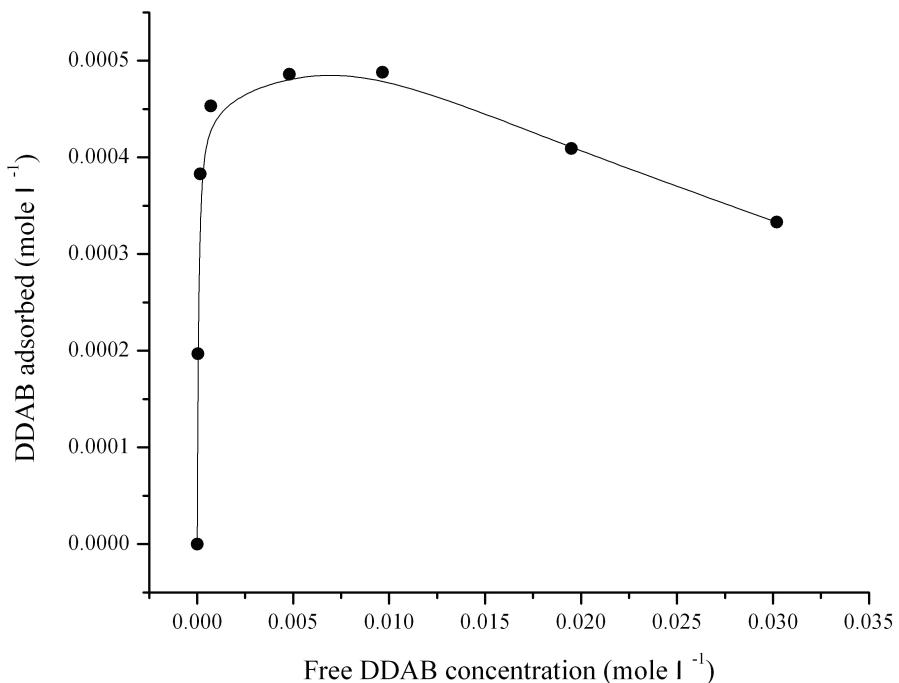
Το πρώτο πράγμα που έπρεπε να επιβεβαιωθεί κατά την ανάπτυξη της μεθόδου ήταν η προσρόφηση των κυστιδίων DDAB στην επιφάνεια της πυριτίας. Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη λήψη φάσματος IR της πυριτίας μετά την εναπόθεση κυστιδίων (σύμφωνα πάντα με την πειραματική πορεία), αφού ξηράθηκε πρώτα σε φιαλίδια Eppendorff μέσα σε ξηραντήρα. Το φάσμα IR του σχήματος 7.1 επιβεβαιώνει την παρουσία DDAB στην επιφάνεια της πυριτίας. Είναι ξεκάθαρη η απορρόφηση των δεσμών μεθυλενίου C–H του DDAB (εσωτερικό σχήμα 6.1) στα 2918cm^{-1} (συμμετρικό) και 2850cm^{-1} (ασύμμετρο), καθώς και του δεσμού C–N στα 1489cm^{-1} . Όπως μπορούμε εύκολα να παρατηρήσουμε, οι δύο πρώτες χορυφές απορρόφησης, οι οποίες δεν υπάρχουν στο φάσμα της καθαρής πυριτίας, εμφανίζονται στο φάσμα της επεξεργασμένης με DDAB πυριτίας, ενώ η τρίτη εμφανίζεται μετατοπισμένη στα 1465cm^{-1} , πιθανώς λόγω του ηλεκτροστατικού δεσμού του $\equiv\text{N}^+$ του DDAB με τη σιλανολική ομάδα [117].

Το ποσό της προσρόφησης των κυστιδίων DDAB στη πυριτία προσδιορίστηκε με μετρήσεις θολερότητας στα 300 nm. Η ισόθερμος που υπολογίστηκε πειραματικά (σχήμα 7.2) ανήκει στον τύπο H με μέγιστο. Γενικά, αυτός ο τύπος ισοθέρμου λαμβάνεται όταν η προσροφημένη ουσία έχει υψηλή χημική συγγένεια με την επιφάνεια, ώστε σε αραιά διαλύματα προσροφάται εντελώς, ενώ η προσρόφηση μειώνεται σταδιακά συναρτήσει της συγκέντρωσης DDAB στο υπερκείμενο νερό. Αυτή η υψηλή χημική συγγένεια του DDAB με τα μόρια της πυριτίας είναι συμβατή με το σχηματισμό ιοντικών ζευγαριών μεταξύ των ομάδων σιλανόλης και του τεταρτοταγούς αμμωνιακού πολικού πυρήνα της επιφανειοδραστικής διπλοστιβάδας (ανταλλαγή πρωτονίου/τετραλκυλαμμωνίου) [117]. Για υψηλότερες συγκεντρώσεις ένα



Σχήμα 7.1. Φάσματα *IR* (α) πυριτίας με και χωρίς προσροφημένο *DDAB* και (β) *DDAB*.

επιπλέον στρώμα παρακείμενων κυστιδίων διαμορφώνεται ενδεχομένως, το οποίο όμως τείνει να μειωθεί όσο η συγκέντρωση του επιφανειοδραστικού αυξάνεται. Πιθανώς οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυστιδίων τα κάνει να δρουν ως συλλέκτες (scavengers) μορίων από την επικαλυμένη επιφάνειας της πυριτίας, πράγμα που μειώνει την προσροφημένη ποσότητα *DDAB* [119]. Το γράφημα του σχεδίου 7.2 δείχνει ότι το μέγιστο ποσό *DDAB* που προσροφήθηκε ήταν $5 \cdot 10^{-4}$ mol/mg πυριτίας (ή 4,62mg *DDAB*/mg πυριτίας), το οποίο είναι σημαντικά υψηλότερο από εκείνο που αναφέρεται για ανιοντικούς σχηματισμούς “μικυλλίων προσρόφησης” (admicelles) στην αλουμίνια. Αυτή η συμπεριφορά αποδίδεται σε δύο λόγους: την υψηλή συγγένεια των κυστιδιακών συσσωματωμάτων με την επιφάνεια της πυριτίας, όπως προαναφέρθηκε, και στο γεγονός ότι τα κυστίδια εμμένουν επάνω στην επιφάνεια της πυριτίας άθικτα, χωρίς αλλίωση της δομής τους [120]. Εφόσον τα σωματίδια πυριτίας που χρησιμοποιήθηκαν εδώ είναι πολύ μεγάλα ώστε να εγκλειστούν μέσα σε κάποιο κυστίδιο [119], υποθέσαμε ότι τα προσροφημένα κυστίδια δημιουργούν ένα τρισδιάστατο στρώμα στη διεπιφάνεια στερεού-υγρού που ενισχύει σημαντικά την επαφή με τα συστατικά του διαλύματος, σε αντίθεση με το δισδιάστατο δίκτυο που παρατηρείται στο σχηματισμό admi-

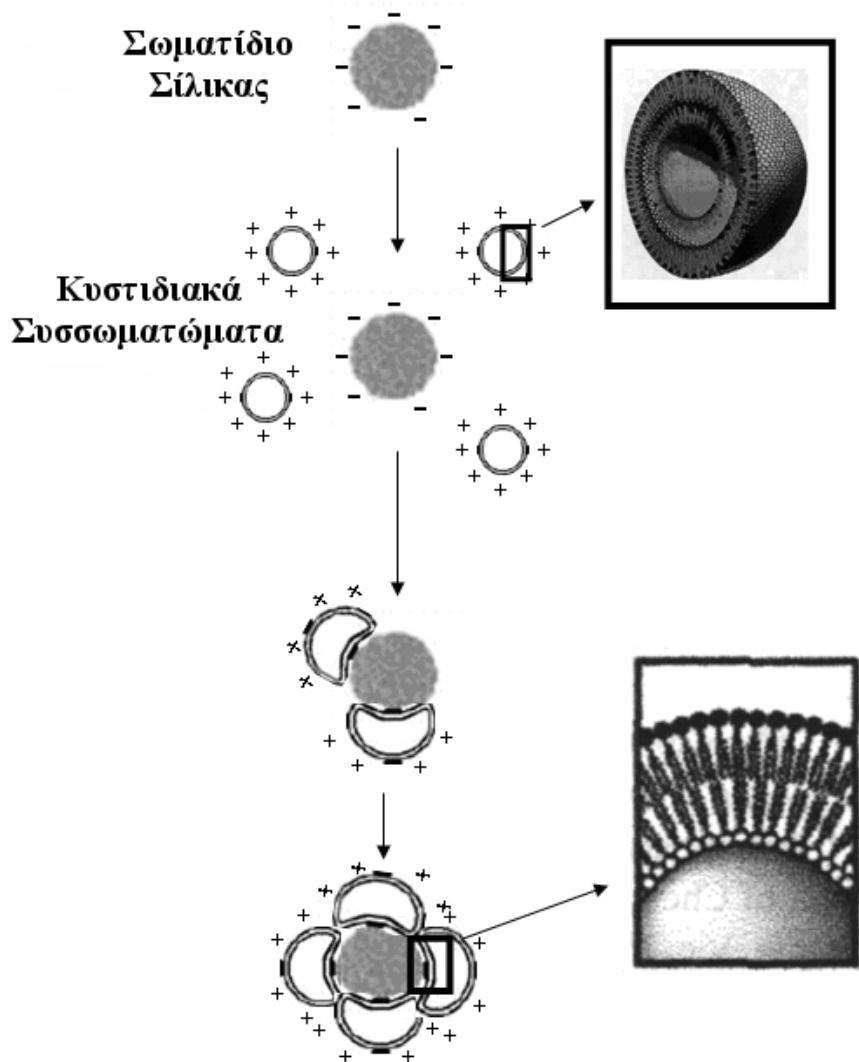


Σχήμα 7.2. Ισόθερμος προσρόφησης DDAB σε πυριτία σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα Hepes. [Hepes]=10 mM ($pH=8,2$), Πυριτία 50 mg.

celles [120, 121]. Ένας προτεινόμενος μηχανισμός εναπόθεσης κυστιδών απεικονίζεται στο σχέδιο 7.3.

7.2 Μελέτη Παραμέτρων

Η ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου απαιτεί την εις βάθος μελέτη πολλών πειραματικών παραμέτρων, όπως συγκέντρωση διαλυμάτων, θερμοκρασία, pH, παρουσία ηλεκτρολυτών, κτλ, ώστε να επιτευχθεί το καλύτερο επιθυμητό αποτέλεσμα. Οι βασικές παράμετροι που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία δίδονται συνοπτικά στον πίνακα 7.1, μαζί με την βέλτιστη πειραματικά ευρεθείσα τιμή τους, ενώ ακολουθεί αναλυτική παρουσίασή τους.



Σχήμα 7.3. Προτεινόμενος μηχανισμός εναπόθεσης κυστιδίων στην επιφάνεια της πυριτίας.

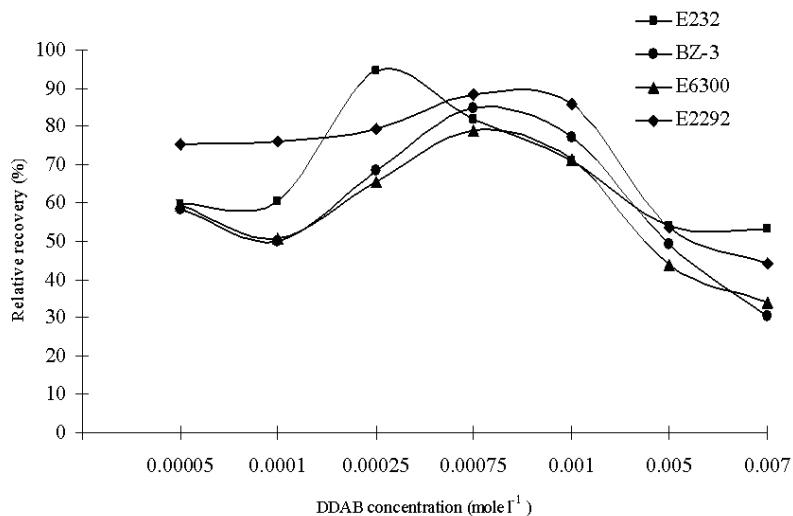
Πίνακας 7.1. Μελετηθήσεις παράμετροι και βέλτιστες τιμές.

Παράμετρος	Περιοχή Μελέτης	Επιλεγμένη Τιμή
DDAB (M)	$5 \cdot 10^{-5} - 7 \cdot 10^{-3}$	$7 \cdot 10^{-4}$
NaBr (M)	0,05 – 2,0	0,2
pH	2 – 10	8,0 – 8,5
Hepes (mM)	5 – 40	10
Όγκος διαφυγής (ml)	100 – 1000	≤ 400
Χρόνος ανάδευσης (λεπτά)	1 – 20	3 – 4
Διαλύτης έκλουσης (μL Μεθανόλης)	250 – 2000	≥ 500
Προσροφητικό μέσο (mg Πυριτίας)	30 – 100	50

7.2.1 Επίδραση της ανάδευσης στο σχηματισμό κυστιδίων και τη “διαλυτότητα προσρόφησης”

Κεντρικό σημείο στην αναλυτική εφαρμογή των κυστιδίων είναι η προετοιμασία τους, όπου πολλές φορές απαιτείται χρήση εξωτερικής ενέργειας [8]. Το DDAB είναι γνωστό ότι παράγει κυστίδια με την απλή διάλυσή του σε απεσταγμένο ύδωρ [13, 125]. Εντούτοις, μια εξωτερική ανατάραξη μπορεί να αλλάξει το ποσοστό και τις ιδιότητες των παραχθέντων κυστιδιακών συσσωματωμάτων, επηρεάζοντας έτσι την απόδοση της εκχύλισης. Για να ερευνηθεί η επιρροή της ανατάραξης στο σχηματισμό κυστιδίων, τα φιαλίδια αναδεύτηκαν έντονα για διάφορα χρονικά διαστήματα μεταξύ 1–30 λεπτών. Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην απόδοση της εκχύλισης ανάμεσα στα διαφορετικού χρόνου αναδευμένα διαλύματα. Δεδομένου ότι σχεδόν σε όλες τις περιστάσεις είναι απαραίτητο να εφαρμοστεί κάποιο είδος ανατάραξης στο σύστημα για ομογενοποίηση, ο σχηματισμός κυστιδίων εξασφαλίζεται εγγενώς. Έτσι συμβιβαστήκαμε με μια περιδίνηση περίπου 3 λεπτών, ώστε να εξασφαλίσουμε το σχηματισμό των κυστιδίων.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, για να υποβοηθηθεί η προσκόλληση κυστιδίων επάνω στην επιφάνεια της πυριτίας, η ανατάραξη είναι επιτακτική [118, 119]. Για να μελετήσουμε την επίδραση αυτής στην απόδοση της εκχύλισης μελετήθηκαν η απαλή ανάδευση, η έντονη (από άκρη σε άκρη) ανάδευση, η περιβίνηση (vortexing) και ανατάραξη με υπέρηχους (sonication). Η εφαρμογή υπερήχων αποδείχθηκε ανεπαρκής, οφειλόμενη ενδεχομένως σε ελλιπή διασπορά των σωματιδίων πυριτίας μέσα στον υδατικό διαλύτη. Η πολύ έντονη ανάδευση παρήγαγε ικανοποιητικές ανακτήσεις αλλά προκάλεσε έντονο άφρισμα, πράγμα ανεπιθύμητο. Η περιδίνηση δεν προκάλεσε άφρισμα και παρείχε υψηλές ανακτήσεις, με μερικά μόνο



Σχήμα 7.4. Επίδραση συγκέντρωσης DDAB στην ανάκτηση των αναλυτών.
 $[Hepes]=10mM$ ($pH=8.2$), $[NaBr]=0.1M$, Πυριτία 50mg.

λεπτά εφαρμογής της - ένα επιπλέον πλεονέκτημα, αφού μειώνεται ο χρόνος της ανάλυσης. Τελικώς, για να εξασφαλίσουμε την πλήρη εναπόθεση κυστιδίων στη πυριτία, τα μίγματα περιδινήθηκαν σε vortex για 3 λεπτά.

7.2.2 Επίδραση της συγκέντρωσης DDAB

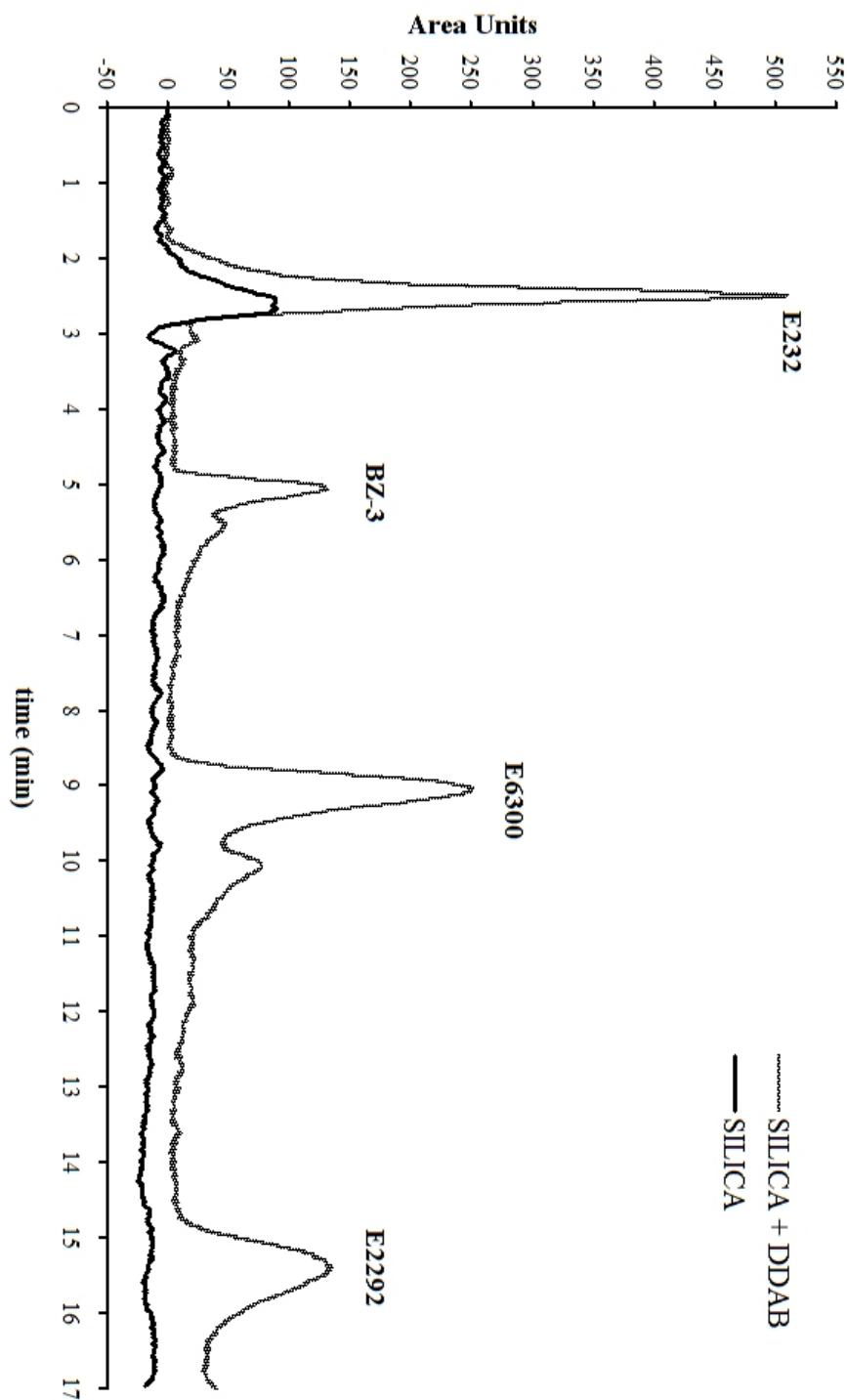
Χωρίς την προσθήκη DDAB, οι προς ανάλυση ενώσεις μας προσροφήθηκαν ελάχιστα στην επιφάνεια της πυριτίας. Για όλα τα συστατικά, η προσρόφηση ήταν μικρότερη από 2%. Εντούτοις, με την προσθήκη ηλεκτρολύτη, η κατάσταση άλλαξε, κυρίως για τους πιο υδρόφιβους αναλύτες. Το E6300 και το E2292 ανιχνεύθηκαν μετα την εκχύλιση. Αυτό αποδόθηκε στην αλλαγή του περιβάλλοντος επιδιαλύτωσης των μη πολικών αναλυτών, οι οποίοι γίνονται λιγότερο υδατοδιαλυτοί παρουσία ηλεκτρολυτών και προσροφούνται περισσότερο στην επιφάνεια της πυριτίας μέσω υδροφιβικών αλληλεπιδράσεων. Τα υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης ήταν περίπου 20% για το E6300 και 30% για το E2292. Έτσι φάνηκε η αναγκαιότητα “τυφλών” (blank) πειραμάτων προκειμένου να εκτιμήσουμε τις επιδράσεις των υπό μελέτη παραμέτρων, χωρίς να συμπεριλάβουμε τη συνεισφορά του ηλεκτρολύτη σ' αυτές.

Όταν προστέθηκε DDAB στο διάλυμα, η κατάσταση άλλαξε δραματικά. Το σχήμα 7.4 δείχνει το ποσοστό ανάκτησης των αναλυτών μετά από εκχύλιση με πυριτία και διάφορες συγκεντρώσεις DDAB σε pH 8,2. Αποδεικνύεται ότι το DDAB ενισχύει σημαντικά την απόδοση της εκχύλισης, κυρίως των πιο υδρόφιβων αναλυτών. Είναι ενδιαφέρον ότι όσο πιο υδρόφιβοι είναι οι αναλύτες, τόσο περισσότερο DDAB χρειάζεται για να βελτιωθεί η εκχύλισή τους. Αυτό αποδίδεται στη σχετικά περιορισμένη ικανότητα των κυστιδίων, έναντι των καθαρών μυκιλίων, να εγκλωβίζουν υδρόφιβα μόρια [126], λόγω του φορτίου τους και της υψηλότερης πυκνότητας υδρογονανθρακιών πυρήνων, πράγμα που μειώνει τη διαλυτοποίηση στο νερό [122, 126, 127]. Μεγαλύτερες ποσότητες DDAB μείωνουν βαθμιαία την “διαλυτότητα προσρόφησης” (adsolubilization) λόγω του ανταγωνισμού των κυστιδίων μέσα στο διάλυμα, ο οποίος αλλάζει τη δομή των προσροφημένων διπλοστιβάδων και μειώνει το προσροφημένο ποσοστό τους, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Αποφασίστηκε τελικά να χρησιμοποιηθεί συγκέντρωση $7 \cdot 10^{-4} M$, η οποία ήταν η χρυσή τομή ανάμεσα στην προσρόφηση υδρόφιλων και υδρόφιβων ενώσεων. Στο σχήμα 7.5 φαίνεται ξεκάθαρα η διαφοροποίηση στην εκχύλιση με και χωρίς προσθήκη DDAB.

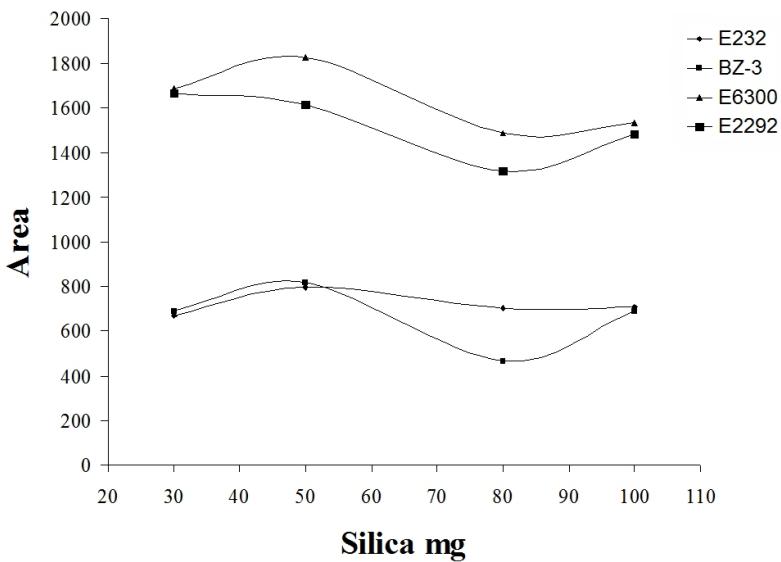
7.2.3 Επίδραση της ποσότητας προσροφητικού και της επεξεργασίας του.

Δεδομένου ότι η συνολική διεργασία εξαρτάται άμεσα από τη “διαλυτοποίηση προσρόφησης” (adsolubilization) των κυστιδίων DDAB στην επιφάνεια της πυριτίας, η αποτελεσματικότητα της μεθόδου θα ήταν άμεσα σχετική με την πυκνότητα φορτίου και την ειδική επιφάνεια του ανόργανου οξειδίου, δηλαδή με την ποσότητα της πυριτίας. Αν και η ποσότητα του προσροφητικού σπάνια δημιουργεί περιορισμούς σε διεργασίες σταθερού όγκου (batch procedures), αποφασίσαμε να μελετήσουμε την επίδραση της ποσότητας πυριτίας, αφού καμία προηγούμενη μελέτη δεν ήταν διαθέσιμη πάνω σε αυτό το θέμα. Τα στοιχεία μας δείχνουν ότι ένα ποσό 50-100mg είναι το βέλτιστο, ειδικά για τις πιο υδρόφιβες ενώσεις (σχήμα 7.6.) Για μεγαλύτερη ποσότητα, παρατηρείται μια μικρή μείωση (< 5%) ενδεχομένως λόγω εναπόθεσης μονής διπλοστιβάδας.

Η προετοιμασία της επιφάνειας της πυριτίας πριν από την εναπόθεση κυστιδίων ήταν η επόμενη παράμετρος που εξετάστηκε για την επίδρασή της στην αναλυτική απόδοση. Η προεπεξεργασία της πυριτίας με οξύ οδήγησε σε υψηλότερη θολερότητα της υδατικής φάσης μετά από κάθε εκχύλιση, απόδειξη της μείωσης της προσρόφησης του επιφανειοδραστικού. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η όξινη επεξεργασία μειώνει τις φορτισμένες επιφανειακές περιοχές, παρέχοντας έτσι λιγότερες ενεργές θέσεις για την προσρόφηση του επιφανειοδραστικού [128]. Εντούτοις, στα πειράματά μας, η όξινη επεξεργασία δεν είχε επιπτώσεις στην εκχύλιση των αναλυτών λόγω της ρύθμισης του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Εν τούτοις, το pH ήταν ελαφρώς μειωμένο· πράγμα που διορθώνεται εύκολα με τη χρήση ρυθμιστικού μεγαλύτερης συγκέντρωσης.



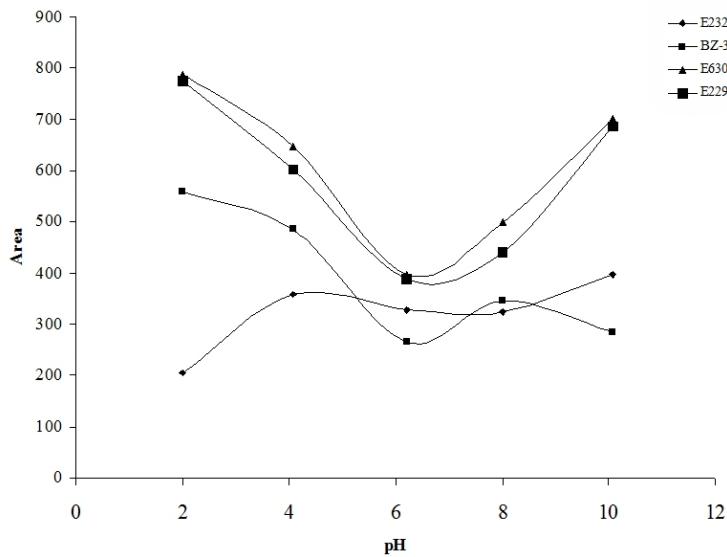
Σχήμα 7.5. Χρωματογράφημα μετά την εκχύλιση με καθαρή πυριτία και πυριτία με DDAB. $[DDAB]=7 \times 10^{-4} M$. $[Hepes]=10 \text{ mM}$ ($pH=8,2$), Πυριτία 50 mg.



Σχήμα 7.6. Επίδραση ποσότητας πυριτίας στην εκχύλιση των αναλυτών. $[Hepes] = 10\text{mM}$ ($\text{pH}=8,2$), $[DDAB] = 7 \times 10^{-4}\text{M}$

7.2.4 Επίδραση pH και ρυθμιστικού διαλύματος

Το φορτίο της επιφάνειας της πυριτίας εξαρτάται έντονα από το pH του διαλύματος. Σε pH περίπου 2, η πυριτία είναι αφόρτιστη και αρχίζει να αποκτά αρνητικό φορτίο καθώς το pH αυξάνεται πάνω από αυτήν την τιμή. Κατά συνέπεια, η ρύθμιση της κατάλληλης τιμής του pH είναι ουσιαστική στη γενική διεργασία. Μεταβάλλοντας το pH του διαλύματος από 2 μέχρι 10 μελετήσαμε το μηχανισμό του προτεινόμενου σχεδίου εχχύλισης. Προφανώς, οι όξινες τιμές pH βοήθησαν περισσότερο την εκχύλιση των υδρόφοβων ενώσεων και λιγότερο των υδρόφιλων. Αυτό αποδίδεται στη μη φορτισμένη επιφάνεια της πυριτίας σε χαμηλό pH, πράγμα που ενισχύει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τις οργανικές ενώσεις του διαλύματος (ειδικά παρουσία ανόργανων αλάτων). Καθώς το pH αυξάνεται, η απόδοση της εκχύλισης από μειωμένη άρχισε να αυξάνεται πάλι σε τιμές pH άνω του 7 (σχήμα 7.7). Αυτή η συμπεριφορά είναι σύμφωνη με την πυκνότητα του φορτίου επιφάνειας της πυριτίας, η οποία αρχίζει από -1 σε pH=6 και αυξάνει μέχρι -18 σε pH 8,2 το οποίο και βοηθάει την προσρόφηση των κυστιδίων DDAB [128]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, πρέπει να διατηρήσουμε τιμές pH άνω του 8 ώστε να εξασφαλίσουμε μέγιστη προσκόλληση κυστιδίων στην αρνητικά φορτισμένη πυριτία. Αν και υψηλότερες τιμές pH έδωσαν κάπως καλύτερα αποτελέσματα, δεν εφαρμόστηκαν λόγω μη διαθέσιμων κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων με αποτελεσματική περιοχή pH σε τέτοιες αλκαλικές συνθήκες. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι αντηλιακές ενώσεις συμπεριφέρονται ως ασθενή οξέα· έτσι σε αλκαλικό περιβάλλον είναι παρούσες με τις ιονισμένες μορφές τους. Το ότι αυξάνεται η εκχύλιση με την αύξηση του pH σημαίνει ότι η προσρόφηση των αναλυτών δεν εξαρτάται μόνο από τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις με τον υδρόφιλο πυρήνα

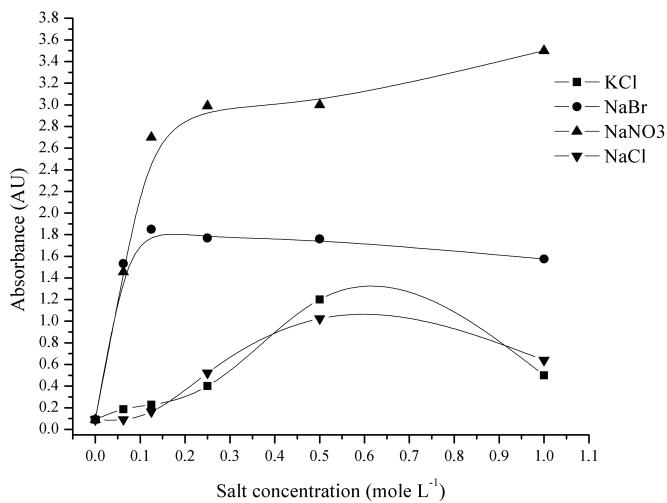


Σχήμα 7.7. Επίδραση pH στην εκχύλιση των αναλυτών. [Hepes]=10mM, Πυριτία 50mg.

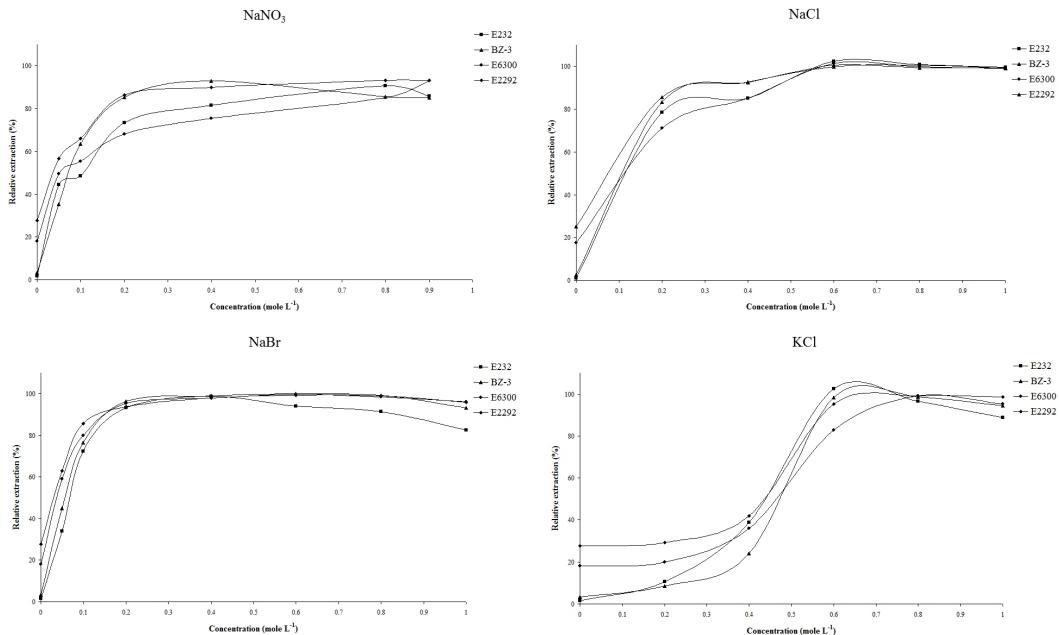
των κυστιδίων ή ακόμα και με τη φορτισμένη τους επιφάνεια. Εντούτοις, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το επιφανειακό φορτίο της πυριτίας μεταβάλλεται όχι μόνο με το pH, αλλά και με την προσρόφηση των επιφανειοδραστικών ενώσεων, εξ αιτίας του ιονισμού των επιφανειακών ομάδων [128]. Ως εκ τούτου, η διατήρηση μιας βέλτιστης τιμής pH είναι ουσιαστική στη γενική διεργασία. Για τον έλεγχο του pH του διαλύματος, αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε ρυθμιστικό διάλυμα. Ανόργανα ρυθμιστικά διαλύματα δεν εξετάστηκαν καθόλου, δεδομένου ότι τα ανιόντα τους μπορούν να αντιδράσουν με τα κατιοντικά κυστίδια, με αρνητικά αποτελέσματα. Από τα εμπορικά διαθέσιμα ρυθμιστικά στην επιθυμητή αποτελεσματική περιοχή pH, μόνο τα Tris και Hepes μελετήθηκαν όσον αφορά την επίδρασή τους στην προσρόφηση των κυστιδίων. Σύμφωνα με αυτές τις μελέτες, το Hepes προκαλεί μια συστηματικά μεγαλύτερη προσρόφηση των επιφανειοδραστικών συγκρινόμενη με τον Tris [118, 119]. Η μεταβολή της συγκέντρωσης Hepes στην περιοχή 5-40 mM δε φάνηκε να επηρεαζει ούτε το pH ούτε την ανάκτηση των αναλυτών. Κατά συνέπεια, αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε μια συγκέντρωση 10 mM στη μέθοδό μας.

7.2.5 Επίδραση των ανόργανων ηλεκτρολυτών

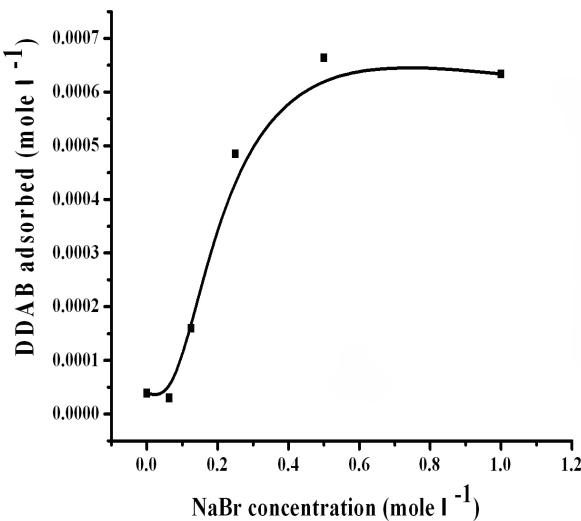
Η προσθήκη ανόργανων ηλεκτρολυτών μπορεί να επιφέρει σημαντικές μεταβολές στην δομή και την ανάπτυξη των κυστιδίων, καθώς και στην προσρόφησή τους πάνω στην επιφάνεια της πυριτίας [126]. Ο τύπος του ηλεκτρολύτη προσδιορίζει το είδος και το μέγεθος αυτών των μεταβολών, αφού τα διάφορα αντισταθμιστικά ιόντα έχουν διαφορετική



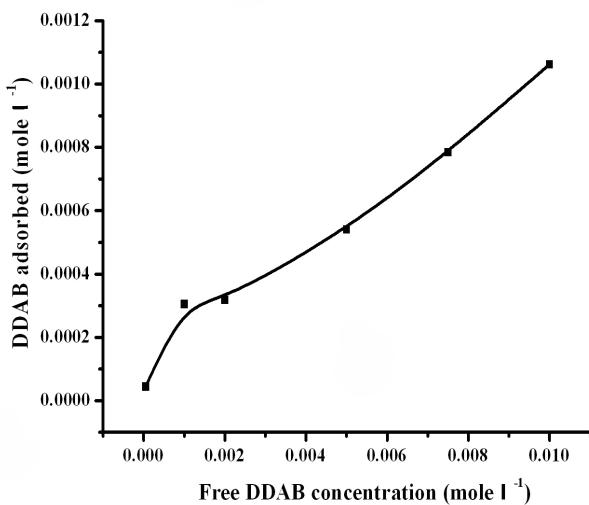
Σχήμα 7.8. Μετρήσεις θολερότητας (σχηματισμός κυστιδίων) διαλύματος DDAB παρουσία ανόργανων ηλεκτρολυτών. $[DDAB]=7 \times 10^{-4} M$, $\lambda=300 nm$.



Σχήμα 7.9. Επίδραση συγκεντρώσεων ανοργάνων ηλεκτρολυτών στην ανάκτηση των αναλυτών. $[DDAB]=7 \times 10^{-4} M$, $[Hepes]=10 mM$ ($pH=8.2$), Πυριτία 50 mg.



Σχήμα 7.10. Ισόθερμος προσρόφησης DDAB στη πυριτία, συναρτήσει $NaBr$. $[Hepes]=10\text{ mM}$ ($pH=8,2$), $[DDAB]=7 \cdot 10^{-4}\text{M}$ $[NaBr]=0,05-2,0\text{M}$, Πυριτία 50 mg.



Σχήμα 7.11. Ισόθερμος προσρόφησης DDAB στη πυριτία σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα $Hepes$, παρουσία $NaBr$. $[Hepes]=10\text{ mM}$ ($pH=8,2$), Πυριτία 50 mg, $[NaBr]=0,1\text{M}$.

επίδραση στις απώσεις μεταξύ των πολικών ομάδων των επιφανειοδραστικών, καθώς και στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συσσωματωμάτων [13]. Μελετήσαμε την απόδοση της εκχύλισης παρουσία διαφόρων ηλεκτρολυτών (NaNO_3 , NaBr , NaCl και KCl) σε αυξανόμενες ποσότητες. Επίσης μελετήθηκαν και τυφλά διαλύματα (χωρίς DDAB) ώστε να μελετήσουμε την επίδραση του άλατος στην άμεση προσρόφηση στη πυριτία. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι το μέγεθος της επίδραση του άλατος στην εκχύλιση ήταν κατά σειρά $\text{NaNO}_3 > \text{KCl} > \text{NaCl} > \text{NaBr}$ για τις περισσότερο υδρόφοβες ενώσεις (E6300 και E2292) και ελάχιστο για τις υπόλοιπες (χυρίως για μεγάλες συγκεντρώσεις άλατος). Σε όλα τα άλατα που μελετήθηκαν παρατηρήθηκε χάποια μέγιστη ανάκτηση (πλατώ) με την αύξηση της συγκέντρωσης, ενώ ακολούθησε πτώση λόγω της καταστροφής των κυστιδών από την υπερτονικότητα του διαλύματος [128]. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η αύξηση της ιοντικής ισχύος έχει μεγαλύτερη επίδραση στις υδρόφοβες παρά στις υδρόφιλες ενώσεις. Τελικά, λαμβάνοντας υπόψην ότι το NaBr έδωσε υψηλό σήμα για όλους τους αναλύτες, ακόμα και χωρίς να υπολογίσουμε την επίδραση του άλατος (σχήμα 7.7), θεωρήθηκε ως βέλτιστο για τη διαδικασία.

Οι υψηλές ανακτήσεις που προσφέρει το NaBr οφείλονται σε δύο βασικούς λόγους. Ο πρώτος είναι ότι το DDAB είναι μια επιφανειοδραστική ένωση που περιέχει Br^- , οπότε δεν γίνεται αντικατάσταση του ανιόντος με κάποιο άλλο, διατηρώντας έτσι τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ των υδρόφιλων κατιοντικών ομάδων οι οποίες προσδίδουν την επιθυμητή κυστοειδή δομή στα τελικά συσσωματώματα (κυστίδια) [125]. Ο δεύτερος λόγος έχει σχέση με τον τύπο του αντισταθμιστικού ίόντος. Εφόσον τα κατιόντα νατρίου είναι ήδη παρόντα στο διάλυμα (από την ακατέργαστη πυριτία), η χρήση ενός ηλεκτρολύτη νατρίου διαβεβαιώνει την απουσία ετερογενούς ανταγωνισμού μεταξύ διαφόρων κατιόντων στην επιφάνεια της πυριτίας. Επιπλέον, η ενέργεια προσρόφησης του κατιόντος διδωδέκυλ-διμεθυλ-αμμωνίου (DDA^+) είναι περίπου 2,3 φορές μεγαλύτερη από αυτή του κατιόντος νατρίου, αντικαθιστώντας αποτελέσματικά το τελευταίο [129], κάτι που δε συμβαίνει πχ. με τα ιόντα καλίου (K^+) τα οποία προσκολλούνται γερά πάνω στην επιφάνεια της πυριτίας.

Μια σημαντική παρατήρηση που έγινε σχετικά με τη χρήση ανόργανων ηλεκτρολυτών είναι η θετική επίδραση που είχαν στο φαινόμενο της προσρόφησης του DDAB στην πυριτία. Σε όλα τα άλατα που μελετήθηκαν, η προσρόφηση του DDAB αυξήθηκε σημαντικά. Τα αποτελέσματα που λάβαμε με τη χρήση του NaBr (σχήματα 7.10 και 7.11) αποκάλυψαν μια υπερδιπλάσια αύξηση στην προσρόφηση των κυστιδών (9,83 mg DDAB / mg πυριτίας), πράγμα που βοήθησε την εκχύλιση των ενώσεων, χωρίς όμως να διακινδυνέψουμε με κορεσμό των διαθέσιμων περιοχών “διαλυτότητας προσρόφησης”.

7.2.6 Επίδραση επιφανειοδραστικών μονής αλυσίδας

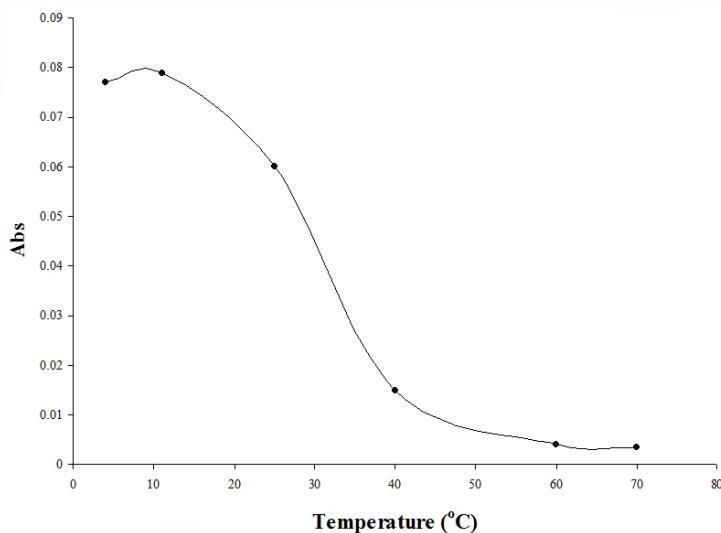
Με την προσθήκη επιφανειοδραστικών ενώσεων μονής αλυσίδας, λαμβάνουν χώρα σημαντικές μεταβολές στην φάση του συστήματος DDAB-ύδατος, λόγω ηλεκτροστατικών

αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφορετικών συσσωματωμάτων [13]. Μετά από διαδοχικές μετρήσεις θολερότητας με προσθήκη 0,05–0,5 mM των επιφανειοδραστικών SDS (ανιοντικό), CTAB (κατιοντικό) ή TX-114 (ουδέτερο), παρατηρήθηκε ότι υπήρξε παρεμβολή της επιπρόσθετης ουσίας στην κυστιδιακή διπλοστιβάδα με συνέπεια την αύξηση των κυστιδίων (αύξηση θολερότητας), η οποία όμως τελικά κατέληξε γρήγορα στην καταστροφή τους (μείωση θολερότητας). Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες σε παρόμοια κολλοειδή συστήματα, αυτή η παρεμβολή έχει αποτέλεσμα μια τήξη μυκιλίων-κυστιδίων μέσω μιας διεργασίας που εξαρτάται από την υδροφοβικότητα του επιφανειοδραστικού, και κατά συνέπεια από την κρίσιμη μικυλλιακή του συγκέντρωση (cmc) [128].

Στο σύστημά μας, η προσθήκη επιφανειοδραστικών ενώσεων μονής αλυσίδας δεν είχε επιπτώσεις στην αναλυτική απόδοση για συγκεντρώσεις μέχρι 0.2 mM, αλλά μείωσε την απόδοση εκχύλισης όλων των αναλυτών σε συγκεντρώσεις άνω των 0.25 mM, φαινόμενο που οφείλεται αφ'ενός στην καταστροφή των κυστιδίων και αφ'ετέρου στον ανταγωνισμό για τις περιοχές προσρόφησης της επιφάνειας της πυριτίας. Έτσι, δεδομένου ότι δεν επιτεύχθηκε καμία βελτίωση, η προσθήκη επιφανειοδραστικού μονής αλυσίδας δεν μελετήθηκε περαιτέρω.

7.2.7 Επίδραση της θερμοκρασίας

Μελετήσαμε επίσης και την επίδραση της θερμοκρασίας, εφόσον είναι γνωστό ότι επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις σχηματισμού/καταστροφής των κυστιδίων. Τα αποτελέσματά μας



Σχήμα 7.12. Επίδραση θερμοκρασίας στο σχηματισμό κυστιδίων. $[DDAB]=7 \cdot 10^{-4} M$, $\lambda=300nm$

έδειξαν (σχήμα 7.12) ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες βοηθούν την εκχύλιση των αναλυτών, πράγμα που συμφωνεί απόλυτα με τη θερμοκρασία μετάβασης φάσης (phase transition temperature) του DDAB, η οποία είναι περίπου 12°C [130]. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, η θολερότητα σταδιακά μειώνεται. Αυτό υποδεικνύει ότι η διαλυτοποίηση των κυστίδων περνάει από μια φυλλωτή φάση σε μια φυλλωτή διάχυση, η οποία καταλήγει στην καταστροφή τους [13]. Αυτή η διεργασία ζεκινάει αρχικά με απώλεια επιφανειοδραστικών μορίων από την εξωτερική στιβάδα των κυστίδων, καθιστώντας το κυστίδιο ασταθές, με αποτέλεσμα να σπάσει σε μικρότερα κομμάτια (μονομερή) τα οποία διαχέονται στο διάλυμα [131]. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες [132], οι χαμηλές θερμοκρασίες (μέχρι 25°C) δε δημιουργούν πρόβλημα στο σχηματισμό και τη σταθερότητα των κυστίδιαν συσσωματωμάτων.

7.2.8 Επίδραση εκλουστικού μέσου

Προκειμένου να μελετήσουμε την επίδραση διαφόρων διαλυτών ως εκλουστικά μέσα των αναλυτών από την επιφάνεια της πυριτίας δοκιμάσαμε τους διαλύτες: μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, ύδωρ, NaCl (0.1M), HCl (0.2M) και NaOH (0.2M). Οι ανόργανοι διαλύτες (NaCl, HCl, NaOH και ύδωρ) παρείχαν πολύ χαμηλές ανακτήσεις. Οι οργανικοί διαλύτες (μεθανόλη και ακετονιτρίλιο) έκλουσαν αποτελεσματικά τους αναλύτες μας, χάρη στην ιδιότητά τους να καταστρέφουν τα κυστίδια. Έτσι για να εξασφαλίσουμε τη μέγιστη προσυγκέντρωση επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε 500 μL μεθανόλης.

7.3 Σύγκριση διάχυσης στερεάς φάσης (SPD) με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)

Υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες, πραγματοποίησαμε και μελέτη off-line εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE). Η διαδικασία είναι ουσιαστικά η ίδια, με μόνη διαφορά ότι η πυριτία δεν προστέθηκε απευθείας στο διάλυμα που περιείχε τους αναλύτες και τα κυστίδια, αλλά το διάλυμα πέρασε με ροή 10 ml/min μέσα από cartridge όπου προϋπήρχαν 50 mg πυριτίας, εγκλιματισμένης με πρότυπο διάλυμα Hepes. Η έκλουση των αναλυτών έγινε με 500 μL μεθανόλης. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 7.2 δείχνουν πως η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) παρήγαγε μικρότερες ανακτήσεις, σε αντίθεση με τη διάχυση στερεάς φάσης (SPD), όπου τα αποτελέσματα ήταν σημαντικώς καλύτερα. Αυτή η συμπεριφορά οφείλεται στη διαφορά εναπόθεσης των κυστίδων πάνω στην επιφάνεια της πυριτίας. Στην SPD τα κυστίδια έρχονται σε ισορροπία με την επιφάνεια της πυριτίας μέσω της έντονης ανάδευσης, όπου και παρατηρείται πλήρης κάλυψη της τελευταίας. Αντίθετα στην SPE τα κυστίδιαν συσσωματώματα προσροφούνται μερικώς πάνω στην πυριτία, χωρίς να επέρχεται

Πίνακας 7.2. Ανακτήσεις αναλυτών σε διάχυση και εχχύλιση στερεάς φάσης.

Αναλύτης	% Ανάκτηση SPD	% Ανάκτηση SPE
E232	98.2 ± 1.2	82.7 ± 4.4
Bz-3	97.4 ± 1.6	68.6 ± 6.0
E6300	98.8 ± 2.0	69.8 ± 5.1
E2292	99.6 ± 2.1	74.3 ± 5.6

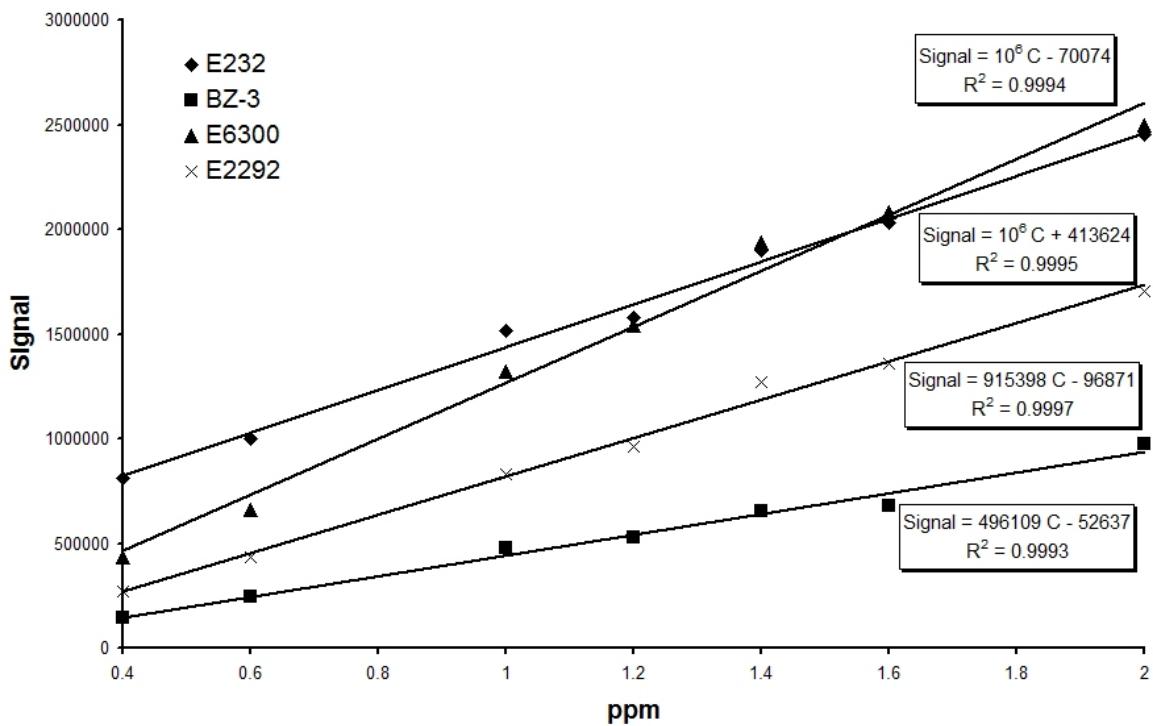
ισορροπία. Επιπλέον, η συνεχής ροή των κυστιδίων πιθανώς να δρα ανταγωνιστικά με τα ήδη προσροφημένα κυστίδια - μια περίπτωση που ήδη έχει παρατηρηθεί κατά την προσρόφηση ανιοντικών κυστιδίων στην επιφάνεια της αλουμίνιας [6, 7].

7.4 'Ογκος διαφυγής (Breakthrough volume)

Ο όγκος διαφυγής στην διεργασία SPD υπολογίστηκε προσυγκεντρώνοντας δείγματα αυξανόμενου όγκου (100-1000mL), τα οποία περιείχαν την ίδια ποσότητα αναλυτών. Θεωρήσαμε ότι συνέβει “διαφυγή” (breakthrough) όταν το ποσό των αναλυτών που εκλούστηκε είχε μειωθεί κατά 5%. Σύμφωνα με τους υπολογισμούς μας, υπό τις βέλτιστες συνθήκες ο μέγιστος όγκος διαλύματος δείγματος ήταν περίπου 400mL. Για μεγαλύτερους όγκους, δεν υπήρξε επαναληπτικότητα στην εχχύλιση των αναλυτών, πιθανώς λόγω της αβεβαιότητας που εισήχθε χρησιμοποιώντας μεγάλους όγκους δειγμάτων.

7.5 Αναγέννηση προσροφητικού μέσου

Λόγω της δυνατότητας των “κυστιδίων προσρόφησης” να εγκλωβίζουν μεγάλες ποσότητες ενώσεων, η ανανέωση του προσροφητικού μέσου προϋποθέτει την πλήρη αφαίρεση κάθε εναπομείναντος προσροφημένου μορίου, καθώς και των επιφανειοδραστικών. Για να είμαστε σίγουροι για αυτό, ξαναεφαρμόστηκε έκπλυση με μεθανόλη και στη συνέχεια με ύδωρ. Έπειτα η επιφάνεια της πυριτίας πλύθηκε διαδοχικά με 0,005 M NaCl για την επαναφορά των ιόντων Na^+ και ύδωρ για τον καθαρισμό από τα περίσσεια ιόντα. Η αναγεννημένη πυριτία, χρησιμοποιήθηκε τουλάχιστον 10 φορές χωρίς μείωση στην δραστικότητά της.



Σχήμα 7.13. Καμπύλες αναφοράς αναλυτικής μεθόδου.

7.6 Αναλυτική αξία της μεθόδου - Εφαρμογές

Για τη δημιουργία των καμπυλών αναφοράς (σχήμα 7.13), 250ml προτύπων διαλυμάτων προσυγκεντρώθηκαν υπό τις προαναφερθείσες βέλτιστες πειραματικές συνθήκες. Για όλους τους αναλύτες βρέθηκε απόλυτη γραμμικότητα μεταξύ του σήματος του ανιχνευτή και της συγκέντρωσής τους. Οι παράμετροι για κάθε καμπύλη αναφοράς, καθώς και το υπολογισμένο όριο ανιχνευσης (τρεις φορές η αναλογία σήματος προς θόρυβο) παρουσιάζονται στον πίνακα 7.3. Με βάση τα δεδομένα μας, υπολογίσαμε ότι σε κάθε mg πυριτίας τροποποιημένης με 10 mg DDAβ προσφορούνται περίπου 0,8 mg αναλυτών. Οι τιμές αυτές είναι πολύ μεγαλύτερες σε σχέση με την αντίστοιχη μέθοδο με ανιοντικά “μυκίλια προσρόφησης” σε αλουμίνια. Οι ανακτήσεις των αναλυτών μετά από 500 φορές προσυγκέντρωση ήταν κοντά στην μονάδα, πράγμα που σημαίνει ποσοτική ανάκτηση. Μεγαλύτεροι συντελεστές προσυγκέντρωσης και μικρότερα όρια ανιχνευσης μπορούν να επιτευχθούν με περαιτέρω εξάτμιση του μεθανολικού εκχυλίσματος ή/και με αύξηση του όγκου του δείγματος.

Η εφαρμογή της παρούσης μεθόδου στην προσυγκέντρωση των αναλυτών από 250 ml ύδατος πριν το χρωματογραφικό προσδιορισμό τους παρουσιάζεται στο σχήμα 7.14. Άμεση εισαγωγή στο σύστημα HPLC δείγματος από νερό πισίνας όπου προστέθησαν από 10 nM

Πίνακας 7.3. Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου.

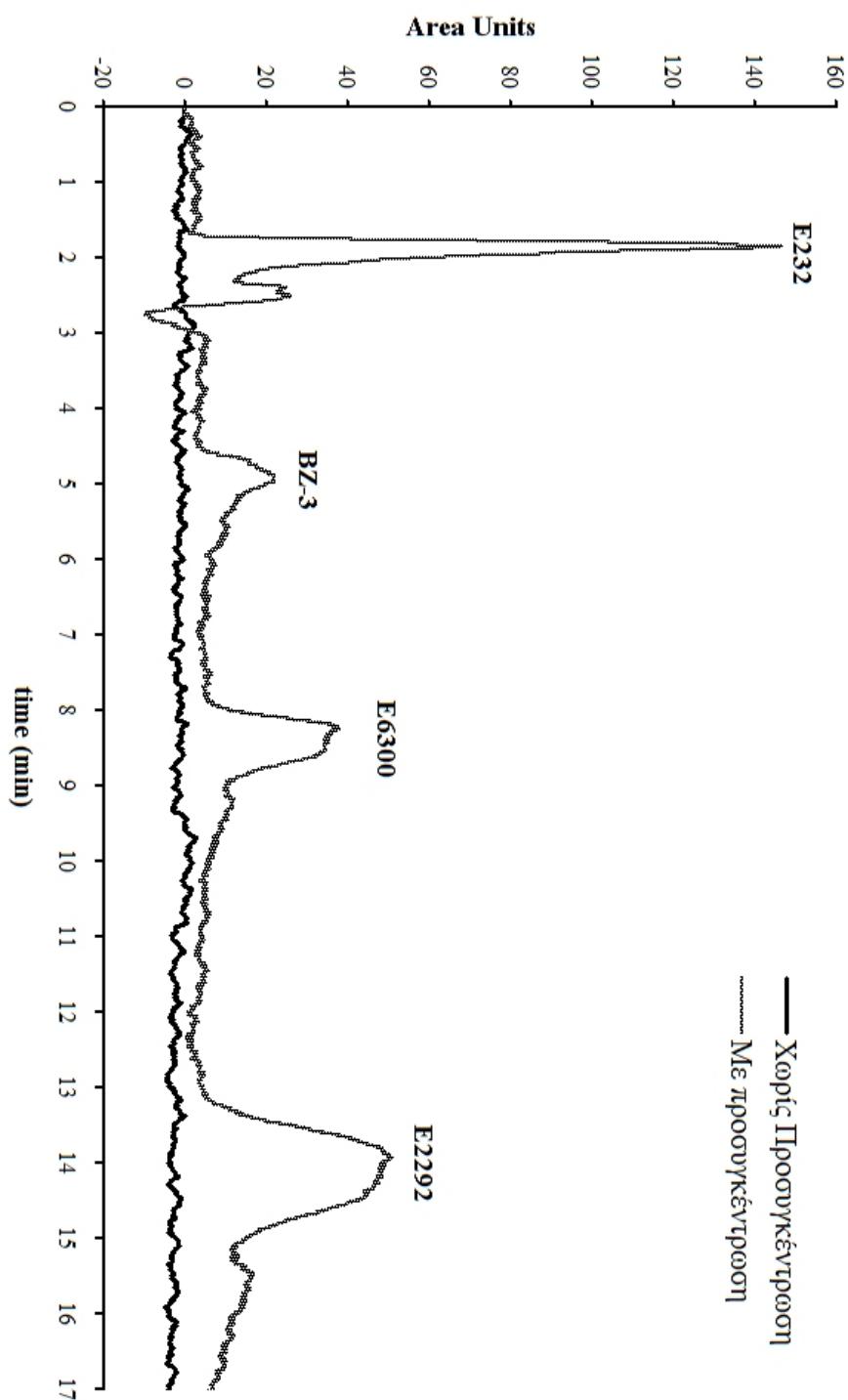
Παράμετρος	E232	Bz-3	E6300	E2292
Παράγων Προσυγκέντρωσης	500	500	500	500
Παράγων Ανάκτησης	0.97	0.98	1.01	1.03
Όριο ανίχνευσης (µg/l)	0.18	1.10	0.64	0.47
RSD (%), n=5	3.54	3.88	4.15	4.58
Συντελεστής Συσχέτησης (r^2)	0.9994	0.9993	0.9995	0.9997

E232, Bz-3, E6300 και E2292 δεν παρήγαγαν καμία κορυφή στον ανιχνευτή. Αντίθετα, μετά από προσυγκέντρωση 500 φορών όλοι οι αναλύτες προσδιορίστηκαν, πράγμα που αποδεικνύει την καταλληλότητα της μεθόδου για την ανίχνευση μικροποσοτήτων τέτοιων ουσιών. Για τον προσδιορισμό των ανακτήσεων κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς με διάλυση των υπό εξέταση ενώσεων σε αποσταγμένο νερό, σε μια περιοχή συγκεντρώσεων 10-100 nM. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ανακτήσεις 96-103%, πράγμα που συμπίπτει και με τις βιβλιογραφιές αναφορές πάνω στην ανίχνευση αντηλιακών ενώσεων σε νερά [133, 134].

Για να αξιολογήσουμε περαιτέρω τη δυνατότητα αναλυτικής εφαρμογής της μεθόδου σε ιδιαίτερα φορτισμένες ενώσεις, τρεις κατιοντικοί δείκτες (Alizarin Red S, Orange II και Thymol Blue) εκχυλίστηκαν σύμφωνα με προαναφερθείσα διαδικασία. Συγκεντρώσεις 0,1-0,5mg/l προστέθηκαν (spiking) σε νερό βρύσης και υπολογίστηκαν οι ανακτήσεις τους σύμφωνα με καμπύλες αναφοράς που κατασκευάστηκαν υπό της ίδιες πειραματικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα του πίνακα 7.4 αποκαλύπτουν ότι οι ιοντικές ενώσεις εκχυλίζονται επίσης αποτελεσματικά λόγω της πολικής φύσης των χυστιδιακών συσσωματομάτων, η οποία διευκολύνει το ποσοτικό διαχωρισμό τους.

Πίνακας 7.4. Ανακτήσεις δεικτών μετά από ASPD.

Συγκέντρωση (mg/L)	Ανάκτηση (%)		
	Alizarin Red S	Orange II	Thymol Blue
0.1	97.4	97.8	98.2
0.2	96.7	98.6	98.6
0.4	98.4	99.0	97.9
0.5	99.1	98.7	98.4



Σχήμα 7.14. Χρωματογράφημα πριν και μετά την προσυγκέντρωση με DDAB.
 $[DDAB]=7 \times 10^{-4} M$. $[Hepes]=10 \text{ mM}$ ($pH=8,2$), Πυριτία 50 mg .

Κεφάλαιο 8

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διατριβή παρουσιάστηκε η αναλυτική χρησιμότητα της αλληλεπίδρασης της πυριτίας με κυστοειδή συσσωματώματα (κυστίδια προσρόφησης – advesicles) σαν μέσα εκχύλισης οργανικών ενώσεων από υδατικά διαλύματα. Βασισμένη στα επιτευχθέντα αποτελέσματα, η παρούσα προσέγγιση παρέχει μια νέα αναλυτική εφαρμογή των οργανωμένων επιφανειοδραστικών δομών, επεκτείνοντας το πεδίο και τις εφαρμογές των προηγούμενων αναλυτικών μεθόδων που βασίζονται στην “διαλυτότητα προσρόφησης” (adsolubilization). Κι αυτό γιατί η καινοτόμος αυτή μέθοδος προσφέρει ιδιαίτερα πλεονεκτήματα, χωρίς όμως σχεδόν όλα τα μειωνεκτήματα των προηγούμενων μεθόδων που χρησιμοποιούσαν “μικύλια προσρόφησης” (admicelles). Κατ’ αρχήν, δεν υπάρχει ανάγκη μελέτης της συγκέντρωσης του επιφανειοδραστικού μέσου ώστε να επιτευχθεί κατάλληλη εκλεκτικότητα, αφού τα “κυστίδια προσρόφησης” εγγενώς διευκολύνουν την εκχύλιση τόσο των φορτισμένων όσο και των μη φορτισμένων ενώσεων, σε μια ενιαία πειραματική διαδικασία. Επιπλέον, η παρουσία ανόργανων ηλεκτολυτών όχι μόνο δεν επηρεάζει αρνητικά τη διεργασία, αλλά αντίθετα, ενισχύει την απόδοση της εκχύλισης και εξασφαλίζει την επαναληπτικότητα της μεθόδου. Τέλος, δεν υπάρχει ανάγκη προεπεξεργασίας του προσροφητικού μέσου (πυριτία), αφού η εναπόθεση των κυστιδίων στην επιφάνειά του είναι μια γρήγορη διαδικασία που λαμβάνει χώρα απλά και μόνο με την ανάμιξη του στερεού με το κυστιδιακό διάλυμα.

Λαμβάνοντας κάποιος υπόψη την πλούσια ποικιλία δομών των κυστιδίων και την μεγάλη διαθεσιμότητα ανόργανων οξειδίων, καθώς και ζεολίθων, μπορεί να φανταστεί το μέγεθος των εναλλακτικών επιλογών που διαθέτει για να σχεδιάσει νέες, συγκεκριμένα προσανατολισμένες, αναλυτικές μεθόδους για εκλεκτική ή γενική μέθοδο εκχύλισης οργανικών ενώσεων. Η δημιουργία μιας on-line διάταξης “εκχύλισης στερεάς φάσης κυστιδίων” σε ζεύξη με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι πιθανώς το πιο προκλητικό βήμα εμπρός στην αναλυτική εφαρμογή των επιφανειοδραστικών ενώσεων!

SUMMARY

Over the past decade, surfactant-based analytical chemistry has rapidly evolved to become one of the most challenging parts of contemporary analytical science. A relatively new concept in the analytical applications of organized surfactant assemblies is their property to organize on various surfaces in a two-dimensional orientation thus giving rise to what is called ad- or hemi-solubilization [1]. This phenomenon refers to the micellar aggregation of ionic surfactant monomers on oppositively charged surfaces, mostly of metal oxides such as alumina, silica, titanium dioxide and ferric oxyhydroxides providing solubilization sites for the partitioning of organic substances. The phenomenon is controlled by the hydrophobicity of the adsolubilizes as well as the microenvironment of the surfactant adsorbed layers and is described by a four region adsorption process (when presented in a double logarithmic scale) which defines the type and shape of aggregates on the surface. It is therefore conceivable that the surpass of a critical concentration is required to allow surfactants to assemble on a given surface but the type of aggregate formed is still subject to controversy [2].

Compared to other micellar media adsolubilization offers several analytical advantages. In the first place, they provide more hydrophobic environments than conventional micellar media approximating the properties of 1-octanol or ethyl acetate [3]. At the same time, the co-adsorption of weak acids or bases, is two to three times larger than the corresponding micellar solubilization constants which enables the efficient partitioning of charged species [4]. Furthermore, the overall process is not only determined by surfactant/surfactant interactions under the solution conditions but also from surfactant/mineral interactions, which defines the aggregate structure on the solid surface. Thus, depending on the concentration either ad- or hemi-micelles can be formed providing different solvation properties for various organic solutes with different polarities [5]. All these advocate to the achievement of high preconcentration factors, competing solid-phase extraction (SPE) for the concentration of various analytes at the ultra low levels. The limitations of these methods lie in the dissociation of surfactants from admicelles that reduces the sample loading capacity and the low tolerance for inorganic electrolytes due to competition with the surfactant for the adsorptive sites of the alumina surface which limits their application to samples with low salt content (<0.2 M) [6, 7].

On the other hand, although a wealth of studies are available on the adsorption of cationic surfactants on various surfaces, no previous study describing such a system for analytical purposes has been presented. Moreover, all analytical methods published hitherto are focused on the formation of micelle-like structures neglecting the potential of vesicles to adsorb on mineral oxides. Thus, the immobilization of ionic surfactant vesicular aggregates on mineral surfaces is an unexplored field of research. However, unlike micellar clusters where a critical concentration gradient should be reached, vesicles inherently ensure the partitioning of polar and apolar analytes due to their structure, consisting of one or more bilayers arranged in a hollow, closed geometry, which incorporates both hydrophilic and hydrophobic cores [7, 8]. Nevertheless, a central point in the analytical application of vesicles has been their preparation since many surfactants with vesicle-forming properties are limited and commercially not available. Moreover, the preparation of vesicles by mixtures of anionic/cationic surfactants (catanionic vesicles) or the use of cosurfactants to aid the process are usually cumbersome and require strict adherence to the experimental procedure since minor deviations can cause dramatically different morphologically structures [9, 10]. More serious still, all methods involving the use of vesicles published so far deal with their application in liquid/liquid extraction procedures and the only known applications of supported vesicles is their utilization as stationary phase modifiers in liquid chromatography and capillary electrophoreses [11, 12].

Symmetric salts of quaternary ammonium surfactants are the most common double-chained amphiphiles of which didodecyldimethylammonium bromide (DDAB) is perhaps the most frequently investigated. Motivated by the fact that DDAB, spontaneously gives birth to vesicular structures in aquatic solutions [13], we investigated the ability of cationic vesicles to adsolubilize on the negatively charged silica surface and interact with organic species in solution. Personal care products residues (commonly deployed in sunscreen formulations) were extracted from swimming pool water under the optimum experimental conditions. The obtained extracts were analyzed by high performance liquid chromatography and UV detection revealing that the proposed methodology offers high recoveries and preconcentration factors. To our knowledge, this study is the first reporting on the analytical utility of supported vesicular aggregates as a new alternative for the concentration of organic amphiphiles from aqueous matrices.

Based on the results obtained, the present approach provides a new insight into the analytical applications of organized surfactant assemblies by extending the scope and application of previous analytical procedures based on adsolubilization. That is because this novel method alleviates the need to manipulate inorganic salt concentration since the addition of salts enhances the extraction performance and ensures method reproducibility. Moreover, there is no need to pre-treat the sorbent (silica oxide) since vesicle deposition is a rapid process accomplished by simple mixing of the sorbent with the vesicular solution. Considering the rich structural variety of vesicles and the availability of mineral surfaces (also including zeolites), one can visualize the vastness of alternative options that can be deployed by designing specifically oriented analytical methods towards the conveyance from

selective to non-selective extractions of organic molecules or vice versa. The on-line set-up coupling of advesicle-based solid-phase extraction to liquid chromatography is probably the most challenging step forward and further research is oriented towards this direction.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] J. Wu, J.H. Harwell, E.A. O'Rear, Langmuir 3 (1987) 531.
- [2] B. Dobias (Ed.), Coagulation and Flocculation, Surfactant Science Series, vol. 47, Marcel Dekker, New York, 1993.
- [3] T. Saitoh, K. Taguchi, M. Hiraide, Anal. Chim. Acta 54 (2002) 203.
- [4] P. Favoriti, V. Monticone, C. Treiner, J. Colloid Interface Sci. 179 (1996) 173.
- [5] T. Behrends, R. Herrman, Phys. Chem. Earth 23 (1998) 229.
- [6] F. Merino, S. Rubio, D. Perez-Bendito, Anal. Chem. 76 (2004) 3878.
- [7] F. Merino, S. Rubio, D. Perez-Bendito, Anal. Chem. 75 (2003) 6799.
- [8] R.G. Laughlin, Colloids Surf. A 128 (1997) 27.
- [9] E.F. Marques, Langmuir 16 (2000) 4798.
- [10] A. Zapf, R. Beck, G. Platz, H. Hoffmann, Adv. Colloid Interface Sci. 100\102 (2003) 349.
- [11] H. Goenaga Infante, M.L. Fernandez Sanchez, A. Sanz-Medel, J. Anal. Atom. Spectrom. 15 (2000) 519.
- [12] M.M. Yassine, C.A. Lucy, Anal. Chem. 76 (2004) 2983.
- [13] E.F. Marques, O. Regev, A. Khan, B. Lindman, Adv. Colloid Interface Sci. 100\102 (2003) 83.
- [14] V. Camel, Spectrochim. Acta Part B 58 (2003) 1177.
- [15] Γ.Ζ. Τσόγκας, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2005.
- [16] C.F. Poole, A.D. Gunatilleka, R. Sethuraman, J. Chromatogr. A 885 (2000) 17.

- [17] V. Pichon, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 195.
- [18] Ekwall P, Mandell L and Fontell K 1969 *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 8 157
- [19] Wennerstrom H and Lindman B 1979 *Phys. Rep.* 52 1
- [20] Tiddy G J T 1980 *Phys. Rep.* 57 1
- [21] Chevalier Y and Zemb T 1990 *Rep. Prog. Phys.* 53 279
- [22] Laughlin R G 1994 *The Aqueous Phase Behavior of Surfactants* (London: Academic)
- [23] Tanford C 1980 *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes* 2nd edn (New York: Wiley)
- [24] Israelachvili J N, Mitchell D J and Ninham B W 1976 *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* 72 1525
- [25] Seifert U 1997 *Adv. Phys.* 46 13
- [26] Zilker A, Ziegler M and Sackmann E 1992 *Phys. Rev. A* 46 7998
- [27] Michaelis X and Bensimon D 1995 *Science* 269 666
- [28] Papahadjopoulos D 1978 *Ann. New York Acad. Sci.* 308 371
- [29] Bangham A D and Horne R W 1964 *J. Mol. Biol.* 8 660
- [30] Bangham A D, Standish MM and Watkins J C 1965 *J. Mol. Biol.* 13 239
- [31] Panizza P, Roux D, Vuillaume V, Lu C Y D and Cates M E 1996 *Langmuir* 12 248
- [32] Regev O and Guillet 1999 *Langmuir* 15 4357
- [33] Israelachvili J N, Mitchell D J and Ninham B W 1977 *Biochim. Biophys. Acta* 470 185
- [34] Schomacker R and Strey R 1994 *J. Phys. Chem.* 98 3908
- [35] Ekwall P, Mandell L and Fontell K 1969 *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 8 157
- [36] Bangham A D 1972 *Annu. Rev. Biochem.* 41 753
- [37] Lipowsky R and Sackmann E (ed) 1995 *Structure and Dynamics of Membranes* (Amsterdam: Elsevier)
- [38] McCalden T A 1990 *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 5 253

- [39] Lasic D D and Rosoff M (ed) 1996 Vesicles (Surface Science Series vol 62) (New York: Dekker) p 447
- [40] Felgner P L 1990 *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 5 163
- [41] Lasic D D 1997 Liposomes Gene Delivery (Boca Raton, FL: Chemical Rubber Company Press)
- [42] Szoka F and Papahadjopoulos D 1980 *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 9 467
- [43] Tadros T F 1993 *Adv. Colloid Interface Sci.* 46 1
- [44] Pavelic Z, Skalko-Basnet N and Schubert R 2001 *Int. J. Pharm.* 219 139
- [45] Papahadjopoulos D and Watkins J C 1967 *Biochim. Biophys. Acta* 135 639
- [46] Johnson S M, Bangham A D, Hill M W and Korn E D 1971 *Biochim. Biophys. Acta* 233 820
- [47] Huang C H 1969 *Biochemistry* 8 344
- [48] Ninham B W, Evans D F and Wei G J 1983 *J. Phys. Chem.* 87 5020
- [49] Brady J E, Evans D F, Kachar B and Ninham B W 1984 *J. Am. Chem. Soc.* 106 4279
- [50] Talmon Y, Evans D F and Ninham B W 1983 *Science* 221 1047
- [51] Hoffmann H, Gräabner D, Hornfeck U and Platz G 1999 *J. Phys. Chem. B* 103 611
- [52] Gebicki J M and Hicks M 1973 *Nature* 243 232
- [53] Gebicki J M and Hicks M 1976 *Chem. Phys. Lipids* 16 142
- [54] Hargreaves J W and Deamer D W 1978 *Biochemistry* 17 3759
- [55] Watanabe K, Nakama Y, Yanaki T and Hoffmann H 2001 *Langmuir* 7219 7224
- [56] Kamenka N, Chorro M, Talmon Y and Zana R 1992 *Colloids Surf.* 67 213
- [57] Kaler E W, Murthy A K, Rodriguez B E and Zasadzinski J A N 1989 *Science* 245 1371
- [58] Kaler E W, Herrington K L, Murthy A K and Zasadzinski J A N 1992 *J. Phys. Chem.* 96 6698
- [59] Herrington K L, Kaler E W, Miller D D, Zasadzinski J A N and Chiruvolu S 1993 *J. Phys. Chem.* 97 13792

- [60] Yatcilla M T, Herrington K L, Brasher L L, Kaler E W, Chiruvolu S and Zasadzinski J A N 1996 *J. Phys. Chem.* 100 5874
- [61] Dubois M, Demé B, Gulik-Krzywicki T, Dedieu J C, Vautrin C, Désert S, Perez E and Zemb T 2001 *Nature* 411 672
- [62] Olson F, Hunt C A, Szoka F C, Vail W J and Papahadjopoulos D 1979 *Biochim. Biophys. Acta* 557 9
- [63] Mayer L D, Hope M J and Culles P R 1986 *Biochim. Biophys. Acta* 858 161
- [64] Zasadzinski J A N 1986 *Biophys. J.* 49 1119
- [65] T. Kunitake, Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 3860.
- [66] G.G. Warr, R. Sen, D.F. Evans, J.E. Trend, *J. Phys.Chem.* 92 (1988) 774.
- [67] F. Caboi, M. Monduzzi, *Langmuir* 12 (1996) 3548.
- [68] T. Matsumoto, T. Hieuchi, K. Horie, *Colloid Polym. Sci.* 267 (1989) 71.
- [69] A.M. Gaudin, D.W. Fuerstenu, *Trans. AIME* 202 (1955) 958.
- [70] T.P. Goloub, L.K. Koopal, B.H. Bijsterbosch, M.P. Sidorova, *Langmuir* 12 (1996) 3188.
- [71] J.L. Trompette, J. Zajac, E. Keh, S. Partyka, *Langmuir* 10 (1994) 812.
- [72] M.R. Bohmer, L.K. Koopal, *Langmuir* 8 (1992) 2649.
- [73] (a) R.K. Iler, *The Chemistry of Silica*, Wiley, 1979
 (b) J.H. Bolt, *J. Phys. Chem.* 61 (1957) 1166.
- [74] L.K. Koopal, T.P. Goloub, Surfactant adsorption and surface solubilization, in: R. Sharma (Ed.), *ACS Symposium Series* 615, vol. 78, American Chemical Society, Washington, DC, 1995.
- [75] P. Wangnerud, G. Olofsson, *J. Colloid Interf. Sci.* 153 (1992) 392.
- [76] T.P. Goloub, M.P. Sidorova, *Kolloid Zh.* 34 (1992) 17.
- [77] D.B. Hough, H.M. Rendall, Adsorption of ionic surfactants, in: G.D. Parfitt, C.H. Rochester (Eds.), *Adsorption from Solutions at the Solid-Liquid Interface*, Academic Press, London, 1983.
- [78] B.H. Bijsterbosch, *J. Colloid Interf. Sci.* 47 (1974) 186.
- [79] H. Rupprecht, E. Ullmann, K. Thoma, *Fortsch. Kolloid Polym.* 55 (1971) 45.

- [80] H. Rupprecht, J. Pharm. Sci. 61 (1972) 700.
- [81] H. Rupprecht, T. Gu, Colloid Polym. Sci. 269 (1991) 506.
- [82] A. Thibaut, A.M. Misselyn-Bauduin, J. Grandjean, G. Broze, R. Jerome, Langmuir 16 (2002) 203.
- [83] Y. Gao, J. Du, T. Gu, J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 (83) (1987) 2671.
- [84] T. Gu, Z. Huang, Colloids Surf. 40 (1989) 71.
- [85] S. Manne, J.P. Cleveland, H.E. Gaub, G.D. Stucky, P.K. Hansma, Langmuir 10 (1994) 4409.
- [86] P. Somasundaran, D.W. Fuerstenau, J. Phys. Chem. 70 (1966) 90.
- [87] A. Fan, P. Somasundaran, N.J. Turro, Langmuir 13 (1997) 506.
- [88] P. Chandar, P. Somasundaran, N.J. Turro, J. Colloid Interf. Sci. 117 (1987) 148.
- [89] P. Chandar, P. Somasundaran, K.C. Waterman, N.J. Turro, J. Phys. Chem. 91 (1987) 148.
- [90] P. Somasundaran, C.V. Kunjappu, C.V. Kumar, N.J. Turro, J.K. Barton, Langmuir 5 (1989) 215.
- [91] Scott, R.P.W; In Practical High Performance Liquid Chromatography. Simpson, C.F ed; Heyden and son's Limited, London, p. 47 (1976).
- [92] Hamilton, R.J; and Sewell, P.A; Introduction to high Performance liquid chromatography.
- [93] Tswett, M; Proc. Warsaw Soc. Nat. Sci (Biol) 14, 6, (1903).
- [94] Tswett, M; Ber. Dtsch. Bot. Ges, 24, 316. 284 (1906).
- [95] Martin, A.J.P; and Synge, R.LM; Biochem. J; 35, 91, 1358. (1941).
- [96] Schupp, O.E; Gas chromatography, in Technique of Organic chemistry. (Perry, E.S and Weissberger A, eds) John Willey and son's inc. New York, USA, vol. x111, (1968).
- [97] Kuhn, R; and Lederer E; Naturwiss, 19, 306, (1931)
- [98] Snyder, L.R; Anal. Chem; 39, 698, 705 (1967).
- [99] Snyder, L.R; and Kirkland, J.J; Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd Ed., Wiley Interscience, USA. (1979).

- [100] Pescok, sheilds, cains and Mc Williams; Mordern methods of chemical Analysis, 2nd ed., John Wiley and son's inc; New York, (1976).
- [101] Simpson, C.F; Practical High Performance Liquid chromatography Heyden and son, London (1979).
- [102] Θ. Π. Χατζηιωάννου, M.A. Κούπαρη; Ενόργανη Ανάλυση, Αθήνα (1990).
- [103] Giddings, J.C; Dynamics of chromatography, Part 1. Principles and Theory, Marcel Dekker, New York, (1965).
- [104] Kirkland, J.J; J. Chromatogr. Sci., 7, 7, (1969)
- [105] Huber. J.F.K; J. Chromatogr. Sci., 7, 85 (1969).
- [106] Horvath, C.G; Preiss, B.A; and Lipsky, S.R; Anal, chem, 39, 1422 (1967).
- [107] Snyder, L.R; In High Performance Liquid Chromatography, Advances and perspectives, vol. 3, (Cs, Horvach ed); Academic Press, New York, p 157 (1983).
- [108] Howard. G.A; and Martin, A.J.P; Bichem. J, 56, 536 (1950).
- [109] Mclander, W.R and Horvath, Cs, In High Performance Liquid Chromatography, Adnances and Perspectives, vol. 2, (Cs Horvath. ed). Academic Press, New York, P. 114 (1980).
- [110] Gonnet C; and Rocca, J.L; J. chromatogr; 120. 419-433 (1976).
- [111] Lindsay S; High Performance Liquid Chromatography, John Wiley and Sons, New York (1989).
- [112] Meyer, V.R; J. Chromatogr. 334, 197 (1985).
- [113] Brown, P.R; High Performance Liquid Chromatography. Biomedical and Bichemical applications; Accademic Press New York (1973).
- [114] Schoemakers P.J; Optimization of chromatographic selectivity, a guide to method development, Elsevier, Amsterdam (1986).
- [115] Colin H, Krstulovic, A.M; Lexcoffier, J and Guiochor G; A guide to the Hplc Literature, John Wiley and sons, New York (1973).
- [116] Knox, J.H; Theory of Hplc, Part I: with special reference to column design. In practical Hplc, (Simpson C.F. ed) Heyden and sons, London (1976).
- [117] M.J. Gradzielski, Phys. Condens. Matter 15 (2003) 655.
- [118] R. Rapuano, A.M. Carmona-Ribeiro, J. Colloid Interface Sci. 193 (1997) 104.

- [119] R. Rapuano, A.M. Carmona-Ribeiro, J. Colloid Interface Sci. 226 (2000) 299.
- [120] T. Saitoh, S. Matsushima, M. Hiraide, J. Chromatogr. A 1040 (2004) 185.
- [121] T. Pradubmook, J.H. OõHaver, P. Malakul, J.H. Harwell, Colloid Surf. A 224 (2003) 93.
- [122] F. Gadelle, W.J. Koros, R.S. Schechter, J. Colloid Interface Sci. 170 (1995) 57.
- [123] A.L. Bernard, M.A. Guedea-Boudeville, L. Jullien, J.M. di Meglio, Langmuir 16 (2000) 6809.
- [124] J.W. Barton, T.P. Fitzgerald, C. Lee, E.A. OõRear, J.H. Harwell, Sep. Sci. Technol. 23 (1988) 637.
- [125] T. Matsumoto, T. Hieuchi, K. Horie, Colloid Polym. Sci. 267 (1989) 71.
- [126] G.Z. Tsogas, D.L. Giokas, E.K. Paleologos, A.G. Vlessidis, N.P. Evmiridis, Anal. Chim. Acta 537 (2005) 239.
- [127] G.Z. Tsogas, D.L. Giokas, A.G. Vlessidis, N.P. Evmiridis, Spectrochim. Acta B 59 (2004) 957.
- [128] R. Atkin, V.S.J. Craig, E.J. Wanless, S. Biggs, Adv. Colloid Interf. Sci. 103 (2003) 219.
- [129] T.P. Goloub, L.K. Koopal, B.H. Bijsterbosch, M.P. Sidorova, Langmuir 12 (1996) 3188.
- [130] N.K. Dimov, V.L. Kolev, P.A. Kralchevsky, L.G. Lyutov, G. Broze, A. Mehreteab, J. Colloid Interface Sci. 256 (2002) 23.
- [131] A. Fontana, P. De Maria, G. Siani, B.H. Robinson, Colloid Surf. B 32 (2003) 365.
- [132] Y. Okahata, R. Ando, Kunitake, T.Ber. Bunsen-Ges, Phys. Chem. 85 (1981) 789.
- [133] D.L. Giokas, G.Z. Tsogas, A.G. Vlessidis, M.I. Karayannis, Anal. Chem. 76 (2004) 1302.
- [134] D.L. Giokas, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, J. Chromatogr. A 1026 (2004) 283.
- [135] D.L. Giokas, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, D.A. Labropoulou, J. Chromatogr. A 1077 (2005) 19.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

1.1	Το μόριο του DDAB.	11
2.1	Εξαρτήματα για SPE.	16
2.2	Διαδικασία SPE.	17
2.3	Επιλογή μεθόδου SPE για την απομόνωση οργανικών ενώσεων από υδατικά διαλύματα.	18
3.1	Γεωμετρία ενός επιφανειοδραστικού μορίου.	20
3.2	Δομές συσσωμάτων επιφανειοδραστικών μορίων.	20
3.3	Αμφίφιλη διπλοστιβάδα.	21
3.4	Το κυστίδιο.	21
3.5	Κυστίδια: (a) Μονοφυλλωτό (b) Πολυφυλλωτό	22
3.6	SEM φωτογραφίες των κυστιδιακών συσσωματωμάτων	23
3.7	Το μόριο του DDAB.	27
3.8	Κυστίδια DDAB φωτογραφημένα με την τεχνική Cryo-TEM.	28
4.1	Σχηματική παράσταση των τύπων των ενεργών ομάδων στην επιφάνεια της πυριτίας.	30
4.2	Επιφάνεια ενός σωματιδίου πυριτίας.	31

4.3 Μοντέλο προσρόφησης των “δύο σταδίων”.	33
4.4 Μοντέλο προσρόφησης των “τεσσάρων περιοχών”.	35
4.5 Σχηματική παράσταση Κυστιδίου Προσρόφησης	37
 5.1 Υποθετικός διαχωρισμός δείγματος αποτελούμενου από τρία επιμέρους συστατικά.	43
5.2 Σχηματική παράσταση συσκευής υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης.	48
5.3 Τρόπος υπολογισμού του παράγοντα ασυμμετρίας χρωματογραφικής κορυφής.	51
5.4 Διαχωρισμός δυο ουσιών με $R_s > 1,5$.	52
5.5 Επίδραση των παραμέτρων R' , N και α στο διαχωρισμό δύο συστατικών δείγματος.	54
 6.1 Συνοπτικό σχεδιάγραμμα πορείας εργασίας με τη μέθοδο διασποράς στερεής φάσης κυστιδίων προσρόφησης (ASPD).	61
6.2 Συνοπτικό σχεδιάγραμμα πορείας εργασίας με τη μέθοδο εκχύλισης στερεής φάσης κυστιδίων προσρόφησης (ASPE).	61
 7.1 Φάσματα IR (α) πυριτίας με και χωρίς προσροφημένο DDAB και (β) DDAB.	64
7.2 Ισόθερμος προσρόφησης DDAB σε πυριτία.	65
7.3 Προτεινόμενος μηχανισμός εναπόθεσης κυστιδίων στην επιφάνεια της πυριτίας.	66
7.4 Επίδραση συγκέντρωσης DDAB στην ανάκτηση.	68
7.5 Χρωματογράφημα μετά την εκχύλιση με καθαρή πυριτία και πυριτία με DDAB.	70
7.6 Επίδραση ποσότητας πυριτίας στην εκχύλιση.	71
7.7 Επίδραση pH στην εκχύλιση.	72
7.8 Μετρήσεις θολερότητας (σχηματισμός κυστιδίων) διαλύματος DDAB παρουσία ανόργανων ηλεκτρολυτών.	73

7.9 Επίδραση συγκεντρώσεων ανοργάνων ηλεκτρολυτών στην ανάκτηση των αναλυτών.	73
7.10 Ισόθερμος προσρόφησης DDAB στη πυριτία, συναρτήσει NaBr.	74
7.11 Ισόθερμος προσρόφησης DDAB στη πυριτία, παρουσία NaBr.	74
7.12 Επίδραση θερμοκρασίας στο σχηματισμό χυστιδίων.	76
7.13 Καμπύλες αναφοράς αναλυτικής μεθόδου.	79
7.14 Χρωματογράφημα πριν και μετά την προσυγκέντρωση με DDAB.	81

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

5.1	Χρονολογική σειρά ανάπτυξης χρωματογραφικών τεχνικών.	40
6.1	Φυσικοχημικές ιδιότητες των μελετημένων οργανικών ενώσεων.	58
7.1	Μελετηθήσεις παράμετροι και βέλτιστες τιμές.	67
7.2	Ανακτήσεις αναλυτών σε διάχυση και εχκύλιση στερεάς φάσης.	78
7.3	Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου.	80
7.4	Ανακτήσεις δεικτών μετά από ASPD.	80