



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Πειραματικός προσδιορισμός συντελεστών οκτανόλης νερού με χρήση υγρής μικροεκχύλισης»

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ : ΜΑΣΤΡΟΜΙΧΑΛΗ ANNA

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ελευθερία Ψυλλάκη (επιβλέπουσα καθηγήτρια)

Νικόλαος Νικολαΐδης

Κωνσταντίνα Τυροβολά

ΧΑΝΙΑ 2009

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
1. Θεωρητικό Μέρος	6
Εισαγωγή	6
1.2. Συντελεστής κατανομής K_{ow}	11
1.2.1. Χρήσεις του K_{ow} :	11
1.2.2. Μέθοδοι προσδιορισμού του K_{ow}	15
1.2.2.1. Άμεσες μέθοδοι προσδιορισμού.....	16
1.2.2.1.1. Μέθοδος ανακινούμενων φιαλών (Shake-flasks method)	16
1.2.2.1.2. Column Generator Techniques (CGT)	17
1.2.2.1.3. Προσδιορισμός K_{ow} βάσει υπολογισμών	17
1.2.2.2. Μέθοδοι μη άμεσου προσδιορισμού (χρωματογραφικές μέθοδοι)	19
1.2.2.2.1. Ηλεκτροκινητική Χρωματογραφία.....	19
1.2.2.2.2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης - HPLC.....	20
(High Performance Liquid Chromatography).....	20
1.2.2.2.3. Εφαρμογές της HPLC	24
1.2.2.2.4. RP-HPLC	25
(Reversed Phase – High Performance Liquid Chromatography).....	25
1.2.3. Εκχύλιση	26
1.2.3.1. Υγρή – Υγρή Εκχύλιση (liquid-liquid extraction , LLE).....	26
1.2.3.2. Μικροεκχύλιση Υγρής Φάσης	27
(Liquid-Phase Microextraction - LPME)	27
1.2.3.3. Εφαρμογές της μικροεκχύλισης υγρής φάσης.....	28
1.2.3.4. Μικροεκχύλιση Μονής Σταγόνας.....	29
(Single-Drop Microextraction - SDME)	29
1.2.3.5. Σύγκριση LPME με SDME.....	32

1.2.3.6. Προτεινόμενη μέθοδος μικροεκχύλισης:.....	33
Μέθοδος μικροεκχύλισης με ελεύθερη σταγόνα	33
(Free Drop Microextraction - FDME)	33
2. Πειραματικό Μέρος	39
2.1. Αντιδραστήρια	39
2.2. Όργανα – Συσκευές	39
2.3. Αναλύσεις με HPLC.....	40
2.4. Προετοιμασία δειγμάτων για εκχύλιση	40
3. Αποτελέσματα – Συμπεράσματα	41
3.1. Υπολογισμός του K_{ow}	41
3.2. Αποτελέσματα - Συμπεράσματα	42
4. Παράρτημα Ι	53
5. Παράρτημα ΙΙ	60

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους ανθρώπους που με βοήθησαν. Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια κ.Ψυλλάκη Ελευθερία για την τιμή που μου έκανε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και για την ευχάριστη και πολύτιμη συνεργασία, όπως επίσης στον κ. Νικολαΐδη Νικόλαο, για τον χρόνο που διέθεσαν για αυτή την εργασία και στην κ.Τυροβολά Κωνσταντίνα για τις πολύτιμες συμβουλές και πληροφορίες που μου έδωσε για το θέμα της διπλωματικής μου.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου Νικήτα και Νικολέττα και τον αδελφό μου Παναγιώτη, για την ηθική και υλική στήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου και για την υπομονή τους και εμπύχωση τους το τελευταίο διάστημα.

Τέλος, ένα ευχαριστώ στους φίλους μου που με στήριξαν όλα αυτά τα χρόνια, για την εμπύχωση και την βοήθεια τον τελευταίο καιρό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός του συντελεστή κατανομής, K_{ow} , με τη χρήση υγρής μικροεκχύλισης με ελεύθερη μικροσταγόνα. Το K_{ow} αντιπροσωπεύει την τάση μιας ένωσης να κατανέμεται μεταξύ μιας οργανικής φάσης και μιας υδατικής φάσης. Μέσω του συντελεστή αυτού φαίνεται το ποσοστό της ουσίας που προσροφάται από την οργανική φάση, που στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν η οκτανόλη, η οποία αποτελεί προσομοίωση του λίπους του ανθρώπινου οργανισμού. Οι ουσίες επιλέχθηκαν με βάση τον υδρόφιλο/υδρόφοβο χαρακτήρα τους και ήταν οι εξής : hydroquinone, dichlorvos, simazine, 2,6-διχλωροφαινόλη, 2,4-διχλωροφαινόλη, ναφθαλένιο και 2,4,6-τριχλωροφαινόλη. Σύμφωνα με τη μέθοδο, η κάθε ουσία εκχυλίζεται από την υδατική φάση κατευθείαν μέσα στην οργανική φάση ως εξής : μία μικροσταγόνα οκτανόλης όγκου 50μL εισάγεται σε υδατικό διάλυμα όγκου 10ml. Στη συνέχεια, το διάλυμα αναδεύεται μέχρι να έρθει σε ισορροπία και έπειτα φυγοκεντρείται για την ανάκτηση της σταγόνας. Από τα αποτελέσματα της μεθόδου προέκυψε ότι το K_{ow} παραμένει σταθερό για την κάθε υπό μελέτη ουσία ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση αυτής.

Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ο μικρός χρόνος που χρειάζονται οι ουσίες για να έρθουν σε ισορροπία ανάμεσα στη φάση του νερού και στη φάση της οκτανόλης. Ένα ακόμα πλεονέκτημα είναι ότι η μέθοδος βοήθησε στην εξέταση ενός μεγάλου εύρους ενώσεων, από πολύ υδρόφιλες μέχρι αρκετά υδρόφοβες ($0.5 < \log K_{ow} < 3.8$). Τέλος, Η χρήση της μειώνει την κατανάλωση διαλυτών λόγω του μικρού όγκου αυτών που χρησιμοποιεί.

Συμπερασματικά, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον άμεσο προσδιορισμό του K_{ow} διαφόρων ουσιών και να δώσει αποτελέσματα με ακρίβεια.

1. Θεωρητικό Μέρος

Εισαγωγή

Η αύξηση της χρήσης υλικών αγαθών, και ενέργειας είχε σαν αποτέλεσμα την αυξημένη ροή ανθρωπογενών οργανικών χημικών ενώσεων στο περιβάλλον. Έχει αποδειχθεί ότι αρκετές από τις χημικές ενώσεις παρ' ότι εκπέμπονται στο περιβάλλον σε συγκεκριμένες περιοχές διασκορπίζονται ταχέως και μπορούν να ανιχνευθούν ακόμα και σε πολύ απομακρυσμένα μέρη από το σημείο εκπομπής τους. Λόγω της πληθώρας των οργανικών ενώσεων που εισέρχονται στο περιβάλλον δεν είναι δυνατή η εκτίμηση των περιβαλλοντικών ιδιοτήτων και συμπεριφοράς της κάθε ένωσης. Για να είναι εφικτή η εκτίμηση και η πρόβλεψη των επιπτώσεων της παρουσίας των χημικών ενώσεων στο περιβάλλον πρέπει να προσδιορίσουμε τις φυσικές, χημικές και βιολογικές παραμέτρους του οικοσυστήματος.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο προσδιορισμός του συντελεστή κατανομής K_{ow} ως δείκτη των παραπάνω διεργασιών αλλά και των αποτελεσμάτων του ως προς τους οργανισμούς, για τις ουσίες hydroquinone, dichlorvos, simazine, 2,6-δichλωροφαινόλη, 2,4-δichλωροφαινόλη, ναφθαλένιο και 2,4,6-τριχλωροφαινόλη.

1.1.1. Hydroquinone

Είναι μια άσπρη κρυσταλλική άοσμη ουσία με χημικό τύπο $C_6H_4(OH)_2$, μοριακό βάρος 110.11 g/mol και μεγάλη διαλυτότητα στο νερό (70 g/L στους 25°C). Έχει σημείο τήξης στους 173-174°C, σημείο βρασμού στους 287°C, σημείο ανάφλεξης στους 165°C, θερμοκρασία αυτανάφλεξης στους 515°C, πίεση ατμού 2.4×10^{-3} Pa (1.8×10^{-5} mmHg) στους 25°C και $\text{Log}K_{ow}$ 0.59.

Παράγεται από βιομηχανίες σε πολλές χώρες. Χρησιμοποιείται σαν εμφανιστικό υγρό στη φωτογραφία, σαν χημικό μέσο για την παραγωγή αντιοξειδωτικών, αντιοζονικών, αγρο-χημικών και πολυμερών.

Χρησιμοποιείται, επίσης, στα καλλυντικά σαν παράγοντας λεύκανσης του δέρματος, στις βαφές μαλλιών και στην παραγωγή φαρμάκων.

Εμφανίζεται στο περιβάλλον σαν αποτέλεσμα ανθρώπινων δραστηριοτήτων, όπως επίσης και φυσικών προϊόντων από φυτά και ζώα. Λόγω των φυσικών και χημικών του ιδιοτήτων κατανέμεται κυρίως στο νερό όταν απελευθερωθεί στο περιβάλλον. Διασπάται με τη βοήθεια φωτοχημικών και βιολογικών διαδικασιών, και συνεπώς δεν παραμένει στο περιβάλλον, γι'αυτό και δεν έχει παρατηρηθεί βιοσυσσώρευση.

Δεν υπάρχουν δεδομένα για συγκεντρώσεις στον αέρα, στο έδαφος ή στο νερό. Παρόλα αυτά, το hydroquinone έχει μετρηθεί στον καπνό άφιλτρων τσιγάρων σε ποσότητες από 110 έως 300 μg ανά τσιγάρο. Ακόμα, έχει βρεθεί σε τρόφιμα που προέρχονται από φυτά (πχ μικρόβια σταριού), σε αφεψήματα όπως ο καφές και το τσάι, όπου η συγκέντρωση υπερβαίνει το 1% μερικές φορές.

Ερασιτέχνες φωτογράφοι μπορεί να εκτεθούν σε hydroquinone μέσω δερματικής επαφής ή μέσω εισπνοής. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν όρια έκθεσης. Η δερματική επαφή μπορεί να συμβεί και μέσω των καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων που το περιέχουν. Οι χώρες της Ευρωπαϊκής Οικονομικής Κοινότητας (Economic Community – EEC) έχουν περιορίσει τη χρήση του στα καλλυντικά σε 2% ή και λιγότερο. Στην Αμερική, ο οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων (Food and Drug Administration) έχει προτείνει συγκεντρώσεις μεταξύ 1.5 και 2% στα προϊόντα λεύκανσης του δέρματος. Σε φάρμακα μπορεί να βρεθούν συγκεντρώσεις μέχρι και 4%.

Λίγα βιομηχανικά δεδομένα υγιεινής είναι διαθέσιμα για το hydroquinone. Μέσες συγκεντρώσεις στον αέρα κατά την παρασκευή και επεξεργασία του είναι από 0,13 έως 0.79 mg/m^3 . Τα όρια έκθεσης σε hydroquinone σε χώρους εργασίας διαφέρουν από χώρα σε χώρα αλλά είναι περίπου 0.5 έως 2 mg/m^3 . Έχει αναφερθεί ότι προκαλεί τοξικότητα αν εισέλθει στον οργανισμό μέσω κατάποσης ή μέσω της χρήσης του σαν εμφανιστικό υγρό στη φωτογραφία. Τα κύρια συμπτώματα δηλητηρίασης από hydroquinone είναι εμετός, γαστρικός πόνος, ταχυκαρδία, τρέμουλο, σπασμοί και κώμα. Έχουν αναφερθεί και θάνατοι έπειτα από τη μη σωστή χρήση του στη φωτογραφία. Μέσω δερματικής επαφής, κυρίως μέσω των καλλυντικών λεύκανσης του δέρματος, μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό και λευκόδερμα. Η επαφή μέσω του αέρα

μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό των ματιών, ευαισθησία στο φως, ακόμα και τύφλωση.

Η αποφυγή των επιπτώσεων στο περιβάλλον μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση κατάλληλων μεθόδων αποθήκευσης, μεταφοράς, χειρισμού και διάθεσης αποβλήτων^[1].

1.1.2. Dichlorvos

Είναι μια άχρωμη υγρή ουσία με ήπια μυρωδιά, με χημικό τύπο $C_4H_7Cl_2O_4P$, μοριακό βάρος 221g/mol και $\log K_{ow}$ 1.45. Είναι διαβρωτική με το σίδηρο και το ασφάλι και υδρολύεται από το νερό σε ρυθμό 3% ανά μέρα σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιείται σαν εντομοκτόνο, για την προστασία αποθηκευμένων προϊόντων και της σοδειάς (κυρίως στα θερμοκήπια), για τον έλεγχο εσωτερικών και εξωτερικών παράσιτων στα εκτρεφόμενα ζώα, για τον έλεγχο των εντόμων σε σπίτια, κτίρια και εξωτερικές περιοχές (σαν αεροζόλ ή υγρό σπρέι). Η ουσία αυτή απορροφάται από τους οργανισμούς μέσω εισπνοής ή κατάποσης και μεταβολίζεται γρήγορα στο συκώτι. Η είσοδός του στον οργανισμό μέσω τροφής ή νερού δεν αποτελεί κίνδυνο για την υγεία, όπως επίσης και η χρήση του ως εντομοαπωθητικό. Παρόλα αυτά, η συνεχής χρήση του (για 24 ώρες την ημέρα) από παιδιά, αρρώστους ή ανθρώπους μεγαλύτερης ηλικίας πρέπει να αποφεύγεται. Σε χώρους εργασίας αν έχουν ληφθεί τα σωστά μέτρα προστασίας, ώστε ο dichlorvos να μην έρχεται σε επαφή με το δέρμα και να υπάρχει σωστός εξαερισμός, τότε δεν υπάρχει κίνδυνος. Η παρουσία του dichlorvos στο έδαφος ή στο νερό δεν οδηγεί σε μακροπρόθεσμα αποτελέσματα, λόγω εξάτμισης και μετατροπής από τους μικροοργανισμούς σε προϊόντα που περιέχουν διχλωροοξικό οξύ. Είναι μέτρια με πολύ τοξικός (εύρος 0,2-10 mg/L) για το νερό και για τα είδη που ζουν σε αυτό^[1].

1.1.3. Simazine

Είναι μια άσπρη κρυσταλλική ουσία. Ο μοριακός του τύπος είναι $C_7H_{12}ClN_5$ και μοριακό βάρος 201.66 g/mol. Έχει πυκνότητα 1.3 kg/dm³, σημείο τήξης στους

225-227°C, σημείο βρασμού στους 100°C, πίεση ατμού 0.000810 mPa στους 20°C, διαλυτότητα 0.0005 g/100 mL και LogK_{ow} 2.18. Χρησιμοποιείται σαν φυτοκτόνο και μπορεί να παραμείνει ενεργό στο έδαφος για 2 με 7 μήνες έπειτα από την εφαρμογή του σε αυτό. Η ουσία είναι τοξική για τους οργανισμούς που ζουν στο νερό. Μπορεί να εισέλθει σε αυτό λόγω εσφαλμένης διάθεσης αποβλήτων των βιομηχανιών^[1].

1.1.4. Naphthalene

Το ναφθαλένιο είναι ένα άσπρος, στερεός υδρογονάνθρακας, κρυσταλλικής μορφής με έντονη μυρωδιά. Έχει μοριακό τύπο C₁₀H₈ και μοριακό βάρος 128 g/mol. Έχει πυκνότητα 1.14 g/cm³, διαλυτότητα στο νερό 30 mg/L, σημείο τήξης 80.55°C, σημείο βρασμού 218°C, σημείο ανάφλεξης 79-87°C, θερμοκρασία αυτανάφλεξης 525°C και logK_{ow} 3.36.

Ίχνη από ναφθαλένιο παράγονται από το φυτό μανόλια, όπως επίσης από ζώα πχ. ελάφια, τερμίτες. Κάποια είδη μυκήτων όπως το muscodor albus παράγει ναφθαλένιο ανάμεσα σε άλλες πτητικές οργανικές ουσίες, ενώ το είδος muscodor vitigenus το παράγει σχεδόν αποκλειστικά. Ακόμα, έχει βρεθεί σε μετεωρίτες που έχουν πέσει στην επιφάνεια της γης. Το ναφθαλένιο μπορεί επίσης να παραχθεί και από την καύση κάρβουνου.

Χρησιμοποιείται σαν χημικό μέσο για την παρασκευή άλλων χημικών, για οικιακή χρήση για την προστασία των ρούχων από έντομα, στη γεωργία σαν εντομοκτόνο, κ.α.

Η έκθεση σε μεγάλες ποσότητες ναφθαλενίου μπορεί να προκαλέσει βλάβη ή καταστροφή σε κύτταρα του αίματος. Ειδικά στα παιδιά έχει εξελιχθεί αυτή η κατάσταση προκαλώντας αιμολυτική αναιμία, έπειτα από την κατάποση της ή μέσω εισπνοής. Στα συμπτώματα συμπεριλαμβάνονται έλλειψη όρεξης, χλωμό δέρμα, ναυτία εμετό, διάρροια, αίμα στα ούρα κ.α. Η Διεθνής Υπηρεσία Έρευνας για τον καρκίνο (IARC) τάσσει το ναφθαλένιο σαν πιθανό καρκινογόνο για τους ανθρώπους και τα ζώα^[1].

1.1.5. Χλωροφαινόλες

Πίνακας 1 : Ιδιότητες χλωροφαινολών

	2.6 - διχλωροφαινόλη	2.4 - διχλωροφαινόλη	2.4.6 - τριχλωροφαινόλη
Χημικός τύπος	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	C ₆ H ₃ Cl ₃ O
Μοριακό βάρος	163	163	197
Πυκνότητα	1.38	1.38	1.49
Σημείο βρασμού	210	219-220	246
Σημείο τήξης	45	68-69	69.5
Σημείο ανάφλεξης	62	62	69.5
Πίεση ατμού	1 mm στους 76.5°C	1 mm στους 59.5°C	1 mm στους 76.5°C
LogK _{ow}	2.75	3.08	3.75

Προέρχονται από τις βιομηχανίες επεξεργασίας ξύλου, από τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται στην γεωργία, από την επεξεργασία υγρών αποβλήτων και νερού (χλωρίωση). Η έλευσή τους από φυσικές πηγές είναι ελάχιστη και δεν συμβάλλει στα συνολικά ποσοστά που υπάρχουν στο περιβάλλον. Η προσρόφηση φαίνεται να έχει ένα σημαντικό ρόλο στα επιφανειακά νερά. Οι χλωροφαινόλες που δεν έχουν διασπαστεί στο νερό συσσωματώνονται στις φερτές ύλες, όπου μπορούν να παραμείνουν για χρόνια και να μεταφερθούν σε μεγάλες αποστάσεις μέσω του νερού.

Αν βρεθούν στο νερό σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να είναι τοξικές για τους οργανισμούς που ζουν σε αυτό και τα φυτά. Χαμηλές τιμές έχουν βρεθεί στο νερό της βροχής, στο χιόνι και τον αέρα μακριά από προφανείς πηγές παραγωγής. Οι χλωροφαινόλες είναι τοξικές για πολλούς οργανισμούς. Μεγάλες ποσότητες χλωροφαινολών χρησιμοποιούνται από βιομηχανίες επεξεργασίας ξύλου. Για τη διατήρηση των ξύλων, όπως επίσης και για προστασία σε γεωργικές και οικιακές εφαρμογές και σαν προσθετικά για την εμπόδιση ανάπτυξης μικροβίων σε ένα μεγάλο εύρος προϊόντων όπως το λάδι και φαρμακευτικά προϊόντα. Η 2.4-διχλωροφαινόλη χρησιμοποιείται για την παραγωγή εντομοκτόνων, η 2.4.6-τριχλωροφαινόλη ως μικροβιοκτόνο και σε ξύλα για την προστασία τους από μύκητες και μούχλα. Στον άνθρωπο, σε χώρους εργασίας προκαλεί ερεθισμό σε μάτια, μύτη και στο αναπνευστικό

σύστημα, δερματίτιδα και πορφυρία. Μπορεί επίσης να προκαλέσει βλάβη στην εγκεφαλική δραστηριότητα και προβλήματα όρασης^[1].

1.2. Συντελεστής κατανομής K_{ow}

Ο συντελεστής κατανομής K_{ow} είναι μια παράμετρος κλειδί για την τύχη των οργανικών ενώσεων στο περιβάλλον. Η τιμή του αντιπροσωπεύει την τάση μιας ένωσης να κατανέμεται μεταξύ μιας οργανικής (πχ. ψάρια, χώμα) φάσης και μιας υδατικής φάσης και σχετίζεται άμεσα με τη διαλυτότητα στο νερό, τους συντελεστές προσρόφησης στο χώμα και τους βαθμούς βιοσυσσώρευσης χημικών ενώσεων σε οργανισμούς. Μέσω του συντελεστή αυτού φαίνεται το ποσοστό της ουσίας που προσροφάται από την οργανική φάση, που στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν η οκτανόλη, η οποία αποτελεί προσομοίωση του λίπους του ανθρώπινου οργανισμού.

Από πειραματικές μετρήσεις έχει βρεθεί ότι η λιποφιλικότητα μιας οργανικής ουσίας σχετίζεται με το συντελεστή κατανομής K_{ow} της ουσίας. Η λιποφιλικότητα αποτελεί μέτρο του υδρόφιλου ή υδρόφοβου χαρακτήρα της οργανικής ουσίας.

Ως συντελεστής κατανομής K_{ow} μιας ένωσης A ορίζεται ο λόγος της συγκέντρωσης της A στην οκτανόλη προς τη συγκέντρωση της A στο νερό σε ισορροπία :

$$K_{ow} = \frac{C_{oc}}{C_w} \quad (1)$$

Μικρές τιμές του συντελεστή K_{ow} (<10) είναι ενδεικτικές για χαμηλή λιποφιλικότητα – υψηλή υδροφιλικότητα και υψηλή διαλυτότητα στο νερό, ενώ σε μεγάλες τιμές του (>10⁴) οι ενώσεις είναι πολύ υδρόφοβες^[2].

1.2.1. Χρήσεις του K_{ow} :

i. QSAR (quantitative structure-activity relationships)

Τα μοντέλα QSAR είναι μέσα αξιολόγησης της εξάρτησης μιας βιολογικής ή περιβαλλοντικής δραστηριότητας στις μοριακές ιδιότητες των χημικών ουσιών. Χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη των βιολογικών, βιοχημικών και

τοξικολογικών αποτελεσμάτων μιας ουσίας. Το βασικό συμπέρασμα είναι ότι η ποικιλία στην δραστηριότητα ανάμεσα στα συστατικά που έχουν παρόμοια δομή μπορεί να συσχετιστεί με αλλαγές στις παραμέτρους που αφορούν στις μοριακές τους ιδιότητες. Τα μοντέλα αυτά συνήθως αναπτύσσονται για ομάδες συστατικών με παρόμοια δομή και χρησιμοποιούνται έπειτα για να προβλέψουν τις πιθανές δραστηριότητες μη εξετασμένων συστατικών με παρόμοια δομή. Οι περισσότερες εφαρμογές των QSAR έχουν συμβεί στους τομείς της φαρμακευτικής και αγροτικής χημείας. Η πλειοψηφία των δημοσιευμένων αναφορών περιλαμβάνουν τον σχεδιασμό φαρμακευτικών προϊόντων για την υγεία των ζώων, όπως επίσης και εντομοκτόνων. Τα QSAR μοντέλα έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη του μηχανισμού δράσης των εντομοκτόνων, αλλά οι QSAR τεχνικές είναι το ίδιο εφαρμόσιμες στην περιγραφή της περιβαλλοντικής δραστηριότητας των φυτοκτόνων που βασίζεται στην χημική δομή [3].

Οι σχέσεις που περιγράφουν αυτά τα μοντέλα είναι της μορφής^[4] :

$$BR = a + bB + cC + \dots \quad (2)$$

όπου

- $BR \rightarrow$ η βιολογική απόκριση,
- $B, C, \dots \rightarrow$ μοριακές ιδιότητες
- $a, b, c, \dots \rightarrow$ εξαρτημένες μεταβλητές.

Οι μοριακές ιδιότητες μπορεί να είναι : $\log K_{ow}$, $(\log K_{ow})^2$, π (παράμετρος υδροφοβίας), σ (παράμετρος Hammett), μοριακό βάρος, κ.α.

Πιο συγκεκριμένα, οι σχέσεις που αφορούν στο $\log K_{ow}$ είναι της μορφής :

$$BR = a + b \cdot \log K_{ow} \quad (3)$$

Στην παραπάνω εξίσωση το BR μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα μεγάλο αριθμό αντιδράσεων των οργανισμών ή μέρος αυτών στην εισαγωγή ξενοβιοτικών συστατικών. Μπορεί να αντιπροσωπεύει την αντίδραση ενός χημικού σε μια βιοχημική αντίδραση ή διαδικασία. Το BR είναι συνήθως $1/C$, όπου C είναι η μοριακή συγκέντρωση ενός χημικού που παράγει ένα σταθερό ενδεικτικό αποτέλεσμα. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να είναι για παράδειγμα :

- LD_{50} (θανάσιμη δόση για το 50% του πληθυσμού που εξετάζεται)

- LC_{50} (θανάσιμη συγκέντρωση για το 50% του πληθυσμού που εξετάζεται)
- ED_{50} (αποτελεσματική δόση για αναισθησία)

ii. Συντελεστής προσρόφησης K_{oc} (organic carbon absorption coefficient)

Ο συντελεστής προσρόφησης K_{oc} εκφράζει την τάση προσρόφησης των διαφόρων χημικών ενώσεων. Ο συντελεστής αυτός είναι το μέτρο της κατανομής της χημικής ένωσης ανάμεσα στο στερεό (έδαφος ή ίζημα) και στην υδατική φάση και είναι ανεξάρτητος των ιδιοτήτων του εδάφους ή του ιζήματος. Χρησιμοποιείται σε μοντέλα που αφορούν την παρουσία ρυπαντών στο έδαφος, σε υπόγεια νερά, σε ποταμούς, κλπ.

Ως συντελεστής προσρόφησης ορίζεται ο λόγος του προσροφηθέντος χημικού προϊόντος ανά βάρος οργανικού άνθρακα προς τη συγκέντρωση του χημικού προϊόντος στο υδατικό διάλυμα^[2].

$$K_{oc} = \frac{\text{μg προσροφούμενης ένωσης/gr οργανικού άνθρακα}}{\text{μg προσροφούμενης ένωσης/ml διαλύματος}} \quad (4)$$

Ο συντελεστής προσρόφησης μπορεί να υπολογιστεί μέσω του συντελεστή κατανομής από τη σχέση : $\log K_{oc} = -0.54 \cdot \log K_{ow} + 1.38$ (5)

iii. Διαλυτότητα

Η διαλυτότητα των οργανικών ενώσεων στο νερό είναι ένας από τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζουν το γίνεσθαι των ενώσεων αυτών στο περιβάλλον. Χημικές ενώσεις με υψηλή διαλυτότητα στο νερό μπορούν να διανεμηθούν εύκολα και γρήγορα από τον υδρογεωλογικό κύκλο, έχουν σχετικά χαμηλούς συντελεστές προσρόφησης στο χώμα και χαμηλούς συντελεστές βιοσυσσώρευσης στους υδατικούς οργανισμούς. Οι ενώσεις

αυτές έχουν την τάση να βιοαποδομούνται πιο εύκολα από μικροοργανισμούς στο χώμα, στα επιφανειακά νερά και στις μονάδες διαχείρισης αποβλήτων.

Ως διαλυτότητα, λοιπόν, ορίζεται η μέγιστη ποσότητα μιας χημικής ένωσης που διαλύεται σε καθαρό νερό σε μια ορισμένη θερμοκρασία. Όταν υπερβαίνουμε τη συγκέντρωση αυτή υφίστανται δύο φάσεις : το κορεσμένο διάλυμα και μια στερεή ή υγρή φάση.

Η διαλυτότητα μπορεί να υπολογιστεί μέσω του συντελεστή κατανομής K_{ow} από τον τύπο : $\log S = -1.37 \cdot \log K_{ow} + 7.26$ (6) για όλους τους τύπους αρωματικών και χλωριωμένων υδρογονανθράκων ή από τον τύπο : $\log S = -0.922 \cdot \log K_{ow} + 4.184$ (7) για όλους τους τύπους εντομοκτόνων (Πίνακας 21, παράρτημα II)^[2].

iv. Βιοσυγκέντρωση

Η συσσώρευση ορισμένων τοξικών ενώσεων σε οργανισμούς θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα περιβαλλοντικά προβλήματα. Συγκεντρώσεις ορισμένων ενώσεων που θεωρούνται ασφαλείς για ορισμένους οργανισμούς (όσον αφορά την άμεση και χρόνια τοξικότητα) μπορούν να συσσωρευτούν στους καταναλωτές των οργανισμών αυτών. Για παράδειγμα, η συσσώρευση καταλοίπων γεωργικών φαρμάκων στα ψάρια, οδήγησε στη μείωση του αναπαραγωγικού δυναμικού ορισμένων πουλιών καταναλωτών των παραπάνω ψαριών.

Πολλές φορές χρειάζεται να εκλυθούν στο περιβάλλον μεγάλες ποσότητες οργανικών (κυρίως) ενώσεων για να σημειωθούν τα αποτελέσματα της τοξικότητας. Καθ' ότι η συνεχής παρακολούθηση των οργανικών χημικών ενώσεων έχει υψηλό κόστος είναι ιδιαίτερα χρήσιμο να βρεθούν αξιόπιστοι συσχετισμοί που θα μας δίνουν την συγκέντρωση στους οργανισμούς αφού γνωρίζουμε την συγκέντρωση στο νερό ή και αντιστρόφως.

Ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης BCF (bioconcentration factor) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της βιοσυσσώρευσης στον άνθρωπο, στα ζώα και στα φυτά και υποδεικνύει τον βαθμό που μία χημική ένωση Α συσσωρεύεται σ' ένα οργανισμό σε σχέση με την συγκέντρωσή της στο περιβάλλον νερό^[2].

$$BCF = \frac{\text{συγκέντρωση της A (σε ισορροπία) στον οργανισμό (υγρό βάρος)}}{\text{μέση συγκέντρωση της A στο νερό}} \quad (8)$$

Ο συντελεστής κατανομής K_{ow} σχετίζεται με τον συντελεστή βιοσυγκέντρωσης μέσω του τύπου : $\log BCF = 0.76 \cdot \log K_{ow} - 0.23$ (9) (Πίνακας 22, παράρτημα II).

ν. Συντελεστής κατανομής K_{sw} (soil-water partition coefficient)

Ο συντελεστής κατανομής K_{sw} δείχνει το βαθμό που μια χημική ένωση συσσωρεύεται στο έδαφος. Μπορεί να προσδιοριστεί μέσω του συντελεστή κατανομής K_{ow} από τη σχέση : $K_{sw} = \frac{c_s}{c_w} = 0.41 \cdot K_{ow} \cdot f_s \cdot d_{compartment}$ (10) , όπου c_s και c_w είναι οι συγκεντρώσεις της ένωσης στο χώμα και στο νερό αντίστοιχα, f_s είναι η οργανική περιεκτικότητα στο χώμα, με τυπική τιμή 0.02 , και $d_{compartment}$ η πυκνότητα του χώματος^[2].

1.2.2. Μέθοδοι προσδιορισμού του K_{ow}

Οι μέθοδοι προσδιορισμού του K_{ow} χωρίζονται σε άμεσες και μη άμεσες. Κάποιες από τις άμεσες είναι η μέθοδος ανακινούμενων φιαλών (shake-flasks method) και η μέθοδος αργής ανάδευσης (slow stirring method), που όμως είναι χρονοβόρες και χρησιμοποιούν μεγάλες ποσότητες διαλύτη. Μια ακόμα άμεση μέθοδος είναι η εκχύλιση κατ' αντιρροή (countercurrent), η οποία έχει όμως ένα ανώτατο όριο στο εύρος του $\log K_{ow}$. Μη άμεσες χρωματογραφικές μέθοδοι είναι η λεπτής στοιβάδας (thin-layer), αντίστροφης φάσης υγρή χρωματογραφία (reversed-phase liquid chromatography) και η ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (electrokinetic chromatography), οι οποίες είναι πιο γρήγορες και πιο εύκολες στο χειρισμό από την παραδοσιακή μέθοδο ανακινούμενων φιαλών (shake-flasks). Κοινό χαρακτηριστικό αυτών είναι ότι ενώ παράγουν αποδεκτές μετρήσεις για συστατικά της ίδιας ομάδας ή ομόλογων σειρών, τα αποτελέσματα είναι φτωχά όταν αναλύονται συστατικά

διαφορετικών ομάδων χωρίς πρώτα να έχουν διαχωριστεί ανάλογα με τη δομή τους^[5].

1.2.2.1. Άμεσες μέθοδοι προσδιορισμού

1.2.2.1.1. Μέθοδος ανακινούμενων φιαλών (Shake-flasks method)

Η μέθοδος των ανακινούμενων φιαλών είναι μια κλασσική μέθοδος για τον προσδιορισμό του $\log K_{ow}$.

Σύμφωνα με τους Schrasder και Andersson^[6] γνωστή ποσότητα της εξεταζόμενης ένωσης τοποθετείται σε διάλυμα οκτανόλης κορεσμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα με συγκεκριμένο με pH. Γίνεται χρήση ενός σωλήνα του οποίου η μία άκρη είναι συνδεδεμένη με μια γυάλινη συσκευή, ενώ η άλλη άκρη είναι σφιχτά κλεισμένη. Ο σωλήνας γεμίζεται με 1-2ml από το διάλυμα της οκτανόλης και βυθίζεται σε 3ml του ρυθμιστικού διαλύματος με pH 11 σε δοκιμαστικό σωλήνα. Όλη η συσκευή τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως, το οποίο είναι βυθισμένο σε μπάνιο υπερήχων. Επιπλέον, μια περισταλτική αντλία ανακυκλώνει το νερό του ποτηριού ζέσεως με τη βοήθεια θερμοστάτη ώστε να είναι σταθερό σε θερμοκρασία $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Έπειτα από την κατεργασία με υπερήχους για 2 ώρες, οι φάσεις διαχωρίζονται και πηγαίνουν για ανάλυση^[6]. Η μέθοδος αυτή, παρόλο που είναι ουσιαστικά σωστή, παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα. Απαιτεί μεγάλο χρόνο ανάλυσης, μεγάλες ποσότητες της ένωσης και παρουσιάζει δυσκολία στον έλεγχο της θερμοκρασίας. Επιπλέον, δεν συνίσταται για ενώσεις με μεγάλη λιποφιλικότητα, δηλαδή για ενώσεις με K_{ow} μεγαλύτερο του 5, γιατί στο νερό εμφανίζεται ένα γαλάκτωμα από την οκτανόλη, το οποίο προκαλεί σημαντικό σφάλμα στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης στο νερό και δεν λαμβάνεται η πραγματική τιμή του K_{ow} ^[5].

Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα της δημιουργίας γαλακτώματος, αναπτύχθηκε η μέθοδος αργής ανάδευσης (slow stirring method). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, οι δύο φάσεις δεν ανακινούνται αλλά αναδεύονται σε θερμοστατικό

δοχείο. Είναι μια άμεση μέθοδος με μεγάλη ακρίβεια και πολύ καλή αναπαραγωγικότητα, με βασικό μειονέκτημά της, όμως, το μεγάλο χρόνο για την επίτευξη ισορροπίας (2-5 ημέρες).

1.2.2.1.2. Column Generator Techniques (CGT)

Στη συγκεκριμένη μέθοδο μια στήλη πληρώνεται με σταγόνες από κάποιο αδρανές υλικό, το οποίο καλύπτεται με νερό κορεσμένο σε οκτανόλη που περιέχει και την ένωση. Νερό περνάει από τη στήλη και έπειτα αποσπάται μέσω ενός οργανικού διαλύτη ή μέσω μιας στήλης C_{18} που είναι αραιωμένη με εξάνιο ή μεθανόλη. Η μέθοδος περιγράφεται από τους De Voe et al.^[1] και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό τιμών του $\log K_{ow}$ που είναι μικρότερες του 6. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η παρακάτω. Περίπου 10mg της εξεταζόμενης ουσίας διαλύεται σε 100ml οκτανόλης. 15ml του διαλύματος αυτού αναδεύεται έντονα με 120 ml νερού για 14-18 ώρες^[7]. Η συγκέντρωση της ουσίας στη φάση της οκτανόλης προσδιορίζεται έπειτα μέσω αέριας χρωματογραφίας. Η μέθοδος αυτή δεν προτιμάται λόγω του μεγάλου χρόνου που χρειάζεται για να δώσει αποτελέσματα, όπως επίσης και λόγω του κόστους^[5].

1.2.2.1.3. Προσδιορισμός K_{ow} βάσει υπολογισμών

Η μέθοδος των Meylan και Howard και η μέθοδος των Hansch και Leo είναι οι δύο βασικότερες υπολογιστικές μέθοδοι που επιτρέπουν την εκτίμηση του συντελεστή K_{ow} των διαφόρων οργανικών ενώσεων αποκλειστικά και μόνο μέσω της μοριακής δομής τους. Βασική ιδέα και για τις δύο μεθόδους είναι ότι οι διάφορες δομικές ομάδες/τμήματα έχουν συγκεκριμένη συνεισφορά στη τιμή του K_{ow} . Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη τις δομικές ομάδες από τις οποίες αποτελείται μια οργανική ένωση και αθροίζοντας τις συνεισφορές των δομικών ομάδων, είναι εφικτός ο προσδιορισμός του K_{ow} της ένωσης. Ωστόσο, με αυτή την προσέγγιση δεν λαμβάνονται υπόψη τα στερεικά φαινόμενα που πιθανώς δημιουργούνται μεταξύ των δομικών

ομάδων (καθώς και άλλες ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις) και γι' αυτό το λόγο είναι συγχρόνως απαραίτητη η χρήση ενός μεγάλου αριθμού διορθωτικών παραγόντων που επιτρέπουν την διόρθωση των υπολογιζόμενων τιμών K_{ow} .

Η μέθοδος των Hansch και Leo δίνει πολύ ακριβή αποτελέσματα, αλλά είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη στην εφαρμογή της και απαιτεί πεπειραμένους χρήστες. Από την άλλη μεριά η μέθοδος των Meylan και Howard, η οποία είναι γνωστή και ως «Μέθοδος συνεισφοράς ατόμων/θραυσμάτων», είναι πιο απλή και χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση των συντελεστών κατανομής K_{ow} . Χρησιμοποιώντας μια μεγάλη βάση δεδομένων K_{ow} , οι συντελεστές συνεισφοράς (f) των θραυσμάτων (Πίνακας 19, παράρτημα II) και οι κατάλληλοι διορθωτικοί παράγοντες (c) προσδιορίστηκαν από τους Meylan και Howard (Πίνακας 19, παράρτημα II). Η τιμή $\log K_{ow}$ μίας ένωσης στους 25°C προσδιορίζεται πολύ απλά από την άθροιση των σταθερών f των θραυσμάτων και των διορθωτικών παραγόντων c σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\log K_{ow} = \sum_k n_k * f_k + \sum_j n_j * c_j + 0.23 \quad (11)$$

όπου n_k και n_j είναι η συχνότητα εμφάνισης για καθένα θραύσμα και για καθένα είδος διορθωτικού παράγοντα, αντίστοιχα, στη δομή της ένωσης. Ουσιαστικά, το μέγεθος των συντελεστών συνεισφοράς των διαφόρων ατόμων/θραυσμάτων (Πίνακας 19, παράρτημα II) καθορίζει το K_{ow} των ενώσεων. Κάθε άτομο άνθρακα αλειφατικού, ολεφινικού ή αρωματικού τύπου έχει θετικό συντελεστή f και επομένως αυξάνει το $\log K_{ow}$. Ωστόσο, οι άνθρακες ολεφινικού και αρωματικού τύπου έχουν χαμηλότερο συντελεστή f σε σχέση με τους αλειφατικούς. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι η τιμή f ενός ατόμου άνθρακα αλειφατικού τύπου μειώνεται όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των απλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα που σχηματίζει μέσα στην ένωση. Με εξαίρεση την περίπτωση του φθόριο που είναι συνδεδεμένο πάνω σε αλειφατικούς άνθρακες, η παρουσία αλογόνων αυξάνει σημαντικά το K_{ow} των οργανικών ενώσεων. Η υδροφοβία των ενώσεων αυξάνεται αντίστοιχα με την αύξηση του μεγέθους των αλογόνων ($I > Br > Cl > F$), ενώ αυτή η επίδραση είναι πιο έντονη όταν τα

αλογόνα συνδέονται με αρωματικές παρά με αλειφατικές ενώσεις. Λειτουργικές ομάδες πολικού χαρακτήρα που περιέχουν άτομα οξυγόνου, αζώτου, θείου και φωσφόρου προκαλούν στις περισσότερες περιπτώσεις μείωση του K_{ow} , κυρίως λόγω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Η αύξηση της υδροφιλίας είναι γενικά πιο έντονη όταν αυτές οι πολικές ομάδες βρίσκονται συνδεδεμένες σε αλειφατικές ενώσεις^[2].

1.2.2.2. Μέθοδοι μη άμεσου προσδιορισμού (χρωματογραφικές μέθοδοι)

1.2.2.2.1. Ηλεκτροκινητική Χρωματογραφία

Στην ηλεκτροκινητική χρωματογραφία ο διαχωρισμός της ουσίας βασίζεται στο διαχωρισμό των συστατικών σε μικκύλια (MEKC) ή σε σταγόνες λαδιού (MEEKC)^[8,9]. Οι Herbert και Dorsey^[10] έχουν μετρήσει τιμές του $\log K_{ow}$ για περισσότερα από 100 συστατικά μέσω της MEKC που σχετίζονται με το $\log K_{ow}$ ($R^2 = 50.835$) για εννέα τάξεις μεγέθους του $\log K_{ow}$. Παρόλα αυτά συγγενική συμπεριφορά παρουσιάστηκε για διαφορετικές ομάδες συστατικών που χρησιμοποιούσαν την MEKC^[11]. Τα βιβλιογραφικά αποτελέσματα δείχνουν ότι οι τιμές του $\log K_{ow}$ που μετρήθηκαν με το σύστημα της MEEKC συσχετίζονται κατά πολύ με το $\log K_{ow}$ ($R^2 > 0.96$) για πάνω από 5-8 τάξεις μεγέθους^[12,13,14,15]. Παρόλα αυτά μόνο λίγες εφαρμογές της MEEKC αναφέρθηκαν για τον προσδιορισμό του $\log K_{ow}$ στην φαρμακευτική^[16,17].

Η MEKC χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της υδροφοβικότητας για έναν αριθμό αρωματικών συστατικών. Πολλές μελέτες έχουν γίνει για να εκτιμηθεί η χρήση της MEKC για μη άμεσο προσδιορισμό της υδροφοβικότητας μέσω της συσχέτισής της με τον παράγοντα $\log K_{ow}$. Πολλά μόρια έχουν εκτιμηθεί συμπεριλαμβανομένου αρωματικών και πολυαρωματικών υδρογονανθράκων, φαρμακευτικά και εντομοκτόνα.

Η MEEKC έχει εφαρμοστεί για το διαχωρισμό μορίων όπως κετόνες και δικετόνες, βιταμινών, στεροειδών, φαρμακευτικών και εντομοκτόνων.

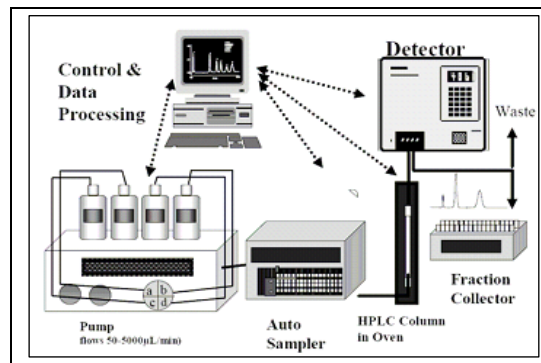
1.2.2.2.2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης - HPLC

(High Performance Liquid Chromatography)

Η τεχνική της HPLC χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση του συντελεστή K_{ow} στην παρούσα μελέτη. Με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός συστατικών ενός υγρού μίγματος, περνώντας το μέσα από μια χρωματογραφική στήλη, με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης. Στην HPLC διακρίνονται δύο φάσεις α) η στατική φάση, που αποτελείται από στερεό πορώδες υλικό, ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα πολύ μικρής διαμέτρου, που βρίσκεται μέσα στη στήλη και β) η κινητή φάση που είναι ένας διαλύτης ή μίγμα διαλυτών. Η διέλευση της κινητής φάσης από τη χρωματογραφική στήλη καλείται έκλουση. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται σαν εκλουστικά πρέπει να απαερώνονται για την αποφυγή φουσαλίδων και ασταθούς πίεσεως στο σύστημα ροής. Στην κινητή φάση ο διαλύτης είναι μη πολικός (πχ εξάνιο), ώστε οι πολικές ενώσεις του μείγματος που περνάνε μέσα από τη στήλη να παραμένουν για περισσότερο χρόνο μέσα σ' αυτή από ότι οι μη πολικές. Έτσι, οι μη πολικές θα περάσουν πιο γρήγορα από τη στήλη. Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική, πραγματοποιείται με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης και έτσι επιτυγχάνονται δύσκολοι διαχωρισμοί μέσα σε λίγα λεπτά^[18].

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αποτελείται από τα τμήματα:

1. Το σύστημα της αντλίας (pump)
2. Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη (injector valve)
3. Στήλη και προστήλη (column & precolumn)
4. Ανιχνευτής (detector)
5. Καταγραφικό – ολοκληρωτής
6. Υπολογιστής – εκτυπωτής



Εικόνα 1 : Τμήματα της HPLC^[16]

i. Σύστημα αντλίας

Το σύστημα αντλίας περιλαμβάνει το δοχείο του διαλύτη, τα διάφορα φίλτρα και τις διατάξεις πίεσης και ροής. Το δοχείο του διαλύτη είναι συνήθως γυάλινη φιάλη για την ισοκρατική έκλουση (isocratic), ή φιάλες και αποστειρώνονται. Η απαέρωση είναι απαραίτητη προκειμένου να φύγουν όλα τα διαλυμένα αέρια και κυρίως το οξυγόνο, που δημιουργούν φυσαλίδες στην κυψελίδα και μη σταθερή πίεση στο κύκλωμα ροής. Η απαέρωση γίνεται, ή με διαβίβαση ηλίου στο χώρο των διαλυτών, ή περνώντας τους μέσα από συσκευή με ειδικές μεμβράνες που κατακρατούν όλα τα διαλυμένα αέρια, ή και με υπέρηχους. Με την αντλία υψηλής πίεσης αφήνεται να περάσει το σύστημα διαλυτών μέσα από τη στήλη, που παρασύρει το δείγμα και διαχωρίζει τα διάφορα συστατικά του, ανάλογα με την πολικότητά τους και σε σχέση με το εκλουστικό σύστημα. Υπάρχουν πολλοί τύποι αντλιών, ιδανική είναι εκείνη που μπορεί να δώσει πίεση μέχρι 6000psi (~400Atm) μέσα από μια στήλη. Ανάλογα με τη σταθερότητα της πίεσης που εξασφαλίζουν, αυξάνει και η τιμή τους. Η σταθερή ροή επηρεάζεται από τον κινητήρα της αντλίας, τις φλάντζες στεγανοποίησης και τη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος. Οι δύο εφαρμοζόμενες τεχνικές ανάλυσης είναι η ισοκρατική έκλουση (isocratic elution) στην οποία η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση καθ' όλη την ανάλυση και η βαθμωτή έκλουση (gradient elution) στην οποία η κινητή φάση μεταβάλλεται βαθμιαία, ή κατά τακτά χρονικά διαστήματα με βάση προγραμματισμό. Αρχικά, εκλούνται τα συστατικά που συγκρατούνται ασθενέστερα από ένα διαλύτη Α με μικρή ισχύ έκλουσης. Στη συνέχεια

παρεμβάλλεται ένας δεύτερος διαλύτης B με μεγαλύτερη ισχύ έκλουσης και αναμιγνύεται με τον A, είτε σε ξεχωριστά στάδια είτε συνεχώς είτε συνεχώς, οπότε αυξάνεται η εκλουστική ικανότητα αυτού του μεικτού διαλύτη και επιτυγχάνεται έτσι η σταδιακή έκλυση όλων των συστατικών. Οι δύο αυτές τεχνικές είναι ανάλογες με την ισόθερμη και την θερμο-προγραμματιζόμενη αέρια χρωματογραφία. Η μεγάλη πίεση απαιτείται προκειμένου το δείγμα να περάσει με μια λογική ταχύτητα ροής μέσα από τη στήλη που είναι γεμάτη με μικρά σωματίδια^[18].

ii. Σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη

Η εισαγωγή του υγρού δείγματος με μικροσύριγγα κατευθείαν στη στήλη, ή συνήθως διαμέσου βαλβίδας εισαγωγής υψηλής πίεσης με βρόγχο. Η ποσότητα το δείγματος κυμαίνεται συνήθως από 5-25 μί. Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτών των βαλβίδων είναι ότι δε διακόπτεται η ροή του εκλουστικού και εφαρμόζονται υψηλές πιέσεις. Σήμερα υπάρχουν βαλβίδες εισαγωγής που επιτρέπουν την εισαγωγή διαφορετικών όγκων στην αναλυτική στήλη. Στην κατεργασία δείγματος στην HPLC με δεδομένο ότι ανιχνεύονται και προσδιορίζονται μικρές συγκεντρώσεις το δείγμα πρέπει να προ-επεξεργάζεται, έτσι ώστε να απαλλαχθεί από τις πιθανές παρεμποδίσεις, όπως αιωρούμενα συστατικά και χημικές παρεμποδίσεις. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται μεγάλη ευαισθησία, εκλεκτικότητα, ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Μια τέτοια τεχνική, που εφαρμόζεται ευρέως σήμερα, είναι αυτή της εκχύλισης υγρού στερεάς φάσης σε στήλη. Κατά' αυτήν επιλέγεται ένα προσροφητικό, με κατάλληλη ενεργή επιφάνεια και διαστάσεις κόκκων και τοποθετείται μέσα σε μια στήλη. Στη συνέχεια, αφήνεται να περάσει μέσα από τη στήλη ένας κατάλληλος διαλύτης και αμέσως μετά το δείγμα, που ρέει μέσα από τη στήλη με τη βοήθεια της βαρύτητας, ή εφαρμόζοντας κενό, ή πίεση. Το συστατικό που εξετάζεται συγκρατείται από την επιφάνεια του στερεού προσροφητικού και στη συνέχεια παραλαμβάνεται απ' αυτό με κάποιο πολικότερο διαλύτη, ή καταλληλότερο και στη συνέχεια μ' αυτή τη μορφή εισάγεται στο όργανο προς ανάλυση^[18].

iii. Στήλες – Προστήλες

Στήλες : οι κυρίως στήλες ή απλά στήλες HPLC είναι κυλινδρικές, από ανοξείδωτο μέταλλο, ή πλαστικό κατάλληλο, ώστε να αντέχουν στις μεγάλες πιέσεις που εξασκούν επάνω τους οι αντλίες. Οι διαστάσεις τους είναι 10 – 50 cm και η διάμετρός τους 1- 5 mm. Το εσωτερικό τους πληρούται με λεπτόκοκκο αδρανές υλικό, που οι πόροι του καλύπτονται με την υγρή στατική φάση. Μια καλά πληρωμένη στήλη μπορεί να έχει απόδοση περίπου 400 θεωρητικών πλακών ανά εκατοστό με σωματίδια 5 - 10 μm . Η διαχωριστική ικανότητα μιας στήλης μπορεί να βελτιωθεί μεταβάλλοντας τον αριθμό των θεωρητικών πλακών N, δηλαδή το μήκος της στήλης, ή μεταβάλλοντας τη διάμετρο των κόκκων του υλικού πλήρωσης, ή αυξομειώνοντας την ταχύτητα της κινητής φάσης.

Οι στήλες πληρούνται γενικά με τρεις τύπους σωματιδίων (πληρωτικών υλικών):

A) τα μικροπορώδη σωματίδια με διάμετρο πόρου 5 -10 μm και τα οποία επιτρέπουν τη δίοδο μόνο μικρού μεγέθους συστατικών.

B) τα μακροπορώδη σωματίδια, που εκτός από μικρούς μοριακούς πόρους διαθέτουν και μεγάλους πόρους διαμέτρου >60 μm που επιτρέπουν τη δίοδο τόσο των μικρών όσο και των μεγάλων συστατικών.

Γ) τα υμενοειδή σωματίδια διαμέτρου 35-45 μm , τα οποία διαθέτουν ένα αδρανή πυρήνα καλυμμένο από ένα υμένα υγρής στατικής φάσης και επιτυγχάνεται υψηλή διαχωριστικότητα για μικρούς όγκους δείγματος.

Προστήλες : οι προστήλες χρησιμοποιούνται για να προστατεύσουν τις στήλες που κοστίζουν ακριβά και έχουν περιορισμένο χρόνο ζωής. Οι στήλες αυτές είναι αρκετά μικρότερες από τις κύριες στήλες, τοποθετούνται μετά τη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος και πριν από την κύρια στήλη. Έτσι, προφυλάσσεται η κύρια στήλη από ανεπιθύμητες παρεμποδίσεις και προσμίξεις, με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται καλύτερη επαναληψιμότητα. Οι προστήλες μπορούν να αντικατασταθούν και με φίλτρα που τοποθετούνται στην ίδια θέση. Ο όγκος της προστήλης σε σχέση με αυτόν της κύριας στήλης είναι 1/15 έως 1/25. Το υλικό πλήρωσής τους στις περισσότερες περιπτώσεις

είναι ίδιο με το υλικό πλήρωσης της κύριας στήλης, με μόνο διαφορά ίσως το μέγεθος των κόκκων. Οι προσθήκες έχουν συγκεκριμένη χωρητικότητα, δηλαδή σημείο κορεσμού, το οποίο φαίνεται από την αντίστροφη πίεση που δημιουργείται και από την κακή επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων των αναλύσεων^[18].

iv. Ανιχνευτής

Ο ανιχνευτής μετρά μία χαρακτηριστική ιδιότητα του διαχωριζόμενου συστατικού, όπως π.χ. η απορρόφηση στο UV, ο φθορισμός, η ηλεκτρική αγωγιμότητα και ανάλογα με τη συγκέντρωσή του, δίνει το κατάλληλο σήμα. Συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή για την ολοκλήρωση του χρωματογραφήματος και τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των συστατικών του μίγματος^[18].

1.2.2.2.3. Εφαρμογές της HPLC

Η HPLC χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολύπλοκων ανόργανων μιγμάτων καθώς και στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για το διαχωρισμό και την ανάλυση μοριακών μιγμάτων ή ιοντικών ενώσεων με χαμηλές τάσεις ατμών καθώς και θερμικά ασταθών ενώσεων, που δεν μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν. Σε αντίθεση με την αέρια χρωματογραφία, χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μιγμάτων ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους και πολικότητας, προσδιορίζοντας σε ιόντα ποσότητες της τάξης του ppb. Η μέθοδος της HPLC έχει πολύ μεγάλη εφαρμογή στην ανάλυση βιολογικών και φαρμακευτικών μιγμάτων καθώς και των μεταβολιτών τους. Στην ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιούνται οι ίδιες τεχνικές με την αέρια χρωματογραφία^[18].

1.2.2.2.4. RP-HPLC

(Reversed Phase – High Performance Liquid Chromatography)

Στην περίπτωση αυτή, η διαδικασία είναι η ίδια, αλλά υπάρχει διαφορά στη στήλη. Η στήλη έχει το ίδιο μέγεθος με αυτή που χρησιμοποιείται στην HPLC, με τη διαφορά ότι η στατική φάση έχει μακριές αλυσίδες υδρογονανθράκων προσκολλημένες στην επιφάνεια της στήλης, συνήθως με 8 (C_8H_{18}) ή 18 ($C_{18}H_{38}$) άτομα άνθρακα που σχηματίζουν ένα υγρό υμένιο που προσροφάται ή δεσμεύεται χημικά στην επιφάνεια ενός στερεού υποστρώματος, συνήθως silica gel. Χρησιμοποιείται ένας πολικός διαλύτης, που μπορεί να είναι νερό μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, τετραϋδροφουράνιο ή μίγμα αυτών. Έτσι, δημιουργείται δυνατή έλξη ανάμεσα στον πολικό διαλύτη και τα πολικά μόρια του μείγματος και όχι ανάμεσα στις αλυσίδες (που είναι η στατική φάση) και τα πολικά μόρια του μείγματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αυτά να κινούνται κατά τον περισσότερο χρόνο με τον διαλύτη. Τα μη πολικά μόρια του μείγματος με τη σειρά τους έλκονται περισσότερο από τις αλυσίδες των υδρογονανθράκων, λόγω των δυνάμεων van der Waals. Θα είναι, επίσης, λιγότερο διαλυτά μέσα στο διαλύτη λόγω της ανάγκης να σπάσουν τους δεσμούς οξυγόνου καθώς πιέζονται ανάμεσα στα μόρια του νερού ή της μεθανόλης για παράδειγμα. Έτσι, αυτά δεν μένουν για πολύ στο διαλύτη και οδηγούνται μέσα στη στήλη. Δηλαδή, τα μόρια που περνάνε πιο γρήγορα μέσα από τη στήλη είναι τα πολικά στην περίπτωση αυτή^[18].

Η τεχνική της RP-HPLC είναι μια συνήθης τεχνική για τον μη άμεσο προσδιορισμό του K_{ow} σαν δείκτη της υδροφιβικότητας των χημικών ενώσεων^[19]. Σύμφωνα με τους Paschke et al.^[19] έγιναν μετρήσεις χρησιμοποιώντας σαν στατική φάση Merck LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m) και μεθανόλη/νερό σαν κινητή φάση. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά συστήματα HPLC : KONTRON σύστημα με UV ανιχνευτή στα 430 nm και θερμοκρασία $298 \pm 0.5K$, με ρυθμό 1ml/min και πίεση 120, 140 bar και Merck-Hitachi σύστημα, με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων, σε θερμοκρασία $298 \pm 0.5K$, ρυθμό 1ml/min και πίεση 99, 174, 195 bar.

Η μέθοδος παρουσιάζει το μειονέκτημα ως προς το εύρος των τιμών του $\log K_{ow}$ που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, καθότι αυτό περιορίζεται σε 0 έως 6^[20], και δεν χρησιμοποιείται για πολύ υδρόφοβες ουσίες^[21].

1.2.3. Εκχύλιση

1.2.3.1. Υγρή – Υγρή Εκχύλιση (liquid-liquid extraction , LLE)

Η υγρή – υγρή εκχύλιση αναφέρεται στην εκχύλιση ενός διαλύματος ουσιών με ένα υγρό διαλύτη. Η διαλυμένη ουσία κατανέμεται μεταξύ των δύο υγρών - φάσεων, χωρίς όμως αυτά να αναμιγνύονται μεταξύ τους. Η μία φάση είναι ένα υδατικό διάλυμα και η άλλη ένας οργανικός διαλύτης, είναι δυνατό όμως να χρησιμοποιηθεί και συνδυασμός δύο διαλυτών. Όταν η ελεύθερη ενέργεια μεταξύ των δύο φάσεων είναι ίδια, τότε η ουσία κατανέμεται μεταξύ αυτών κατά ορισμένη αναλογία και αποκαθίσταται ισορροπία.

Βασικό πλεονέκτημα της υγρής – υγρής εκχύλισης είναι ότι τα υδατικά διαλύματα τα οποία περιέχουν αιωρούμενη σωματιδιακή ύλη μπορούν να εκχυλιστούν χωρίς να προηγηθεί φιλτράρισμα του διαλύματος. Με τον τρόπο αυτό, γίνεται εφικτός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του υδατικού και σωματιδιακού κλάσματος στο νερό, ενώ αν ζητείται μόνο το περιεχόμενο της υδατικής φάσης τότε τα δείγματα μπορούν να φιλτραριστούν^[22].

Η υγρή – υγρή εκχύλιση βρίσκει εφαρμογές στον προσδιορισμό περιβαλλοντικών ρύπων, παρουσιάζει όμως κάποια μειονεκτήματα. Βασικό μειονέκτημα είναι η δημιουργία γαλακτώματος κατά τη διεξαγωγή της, το οποίο εμποδίζει τον αυτοματισμό της μεθόδου. Επιπλέον, οι μεγάλες ποσότητες τοξικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται θέτουν κινδύνους για την υγεία των χρηστών της μεθόδου και δημιουργούν, επίσης, επικίνδυνα εργαστηριακά απόβλητα, γεγονός που συνεπάγεται μεγαλύτερο κόστος για την επεξεργασία τους. Επιπροσθέτως, υπάρχουν προβλήματα κατά τη χρήση της μεθόδου δεδομένου ότι έχει πολλά στάδια για την εφαρμογή της, με αποτέλεσμα τις απώλειες αναλυτών κατά τη διαδικασία αλλά και την αύξηση

πιθανοτήτων λάθους από τους χρήστες. Τέλος, η μέθοδος είναι χρονοβόρα λόγω των πολλών σταδίων που την απαρτίζουν^[23].

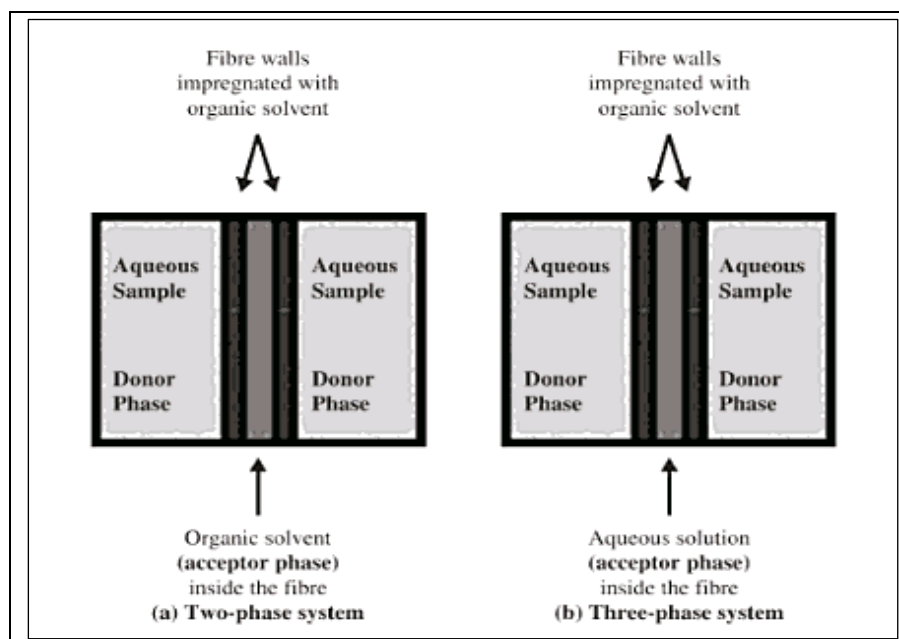
1.2.3.2. Μικροεκχύλιση Υγρής Φάσης

(Liquid-Phase Microextraction - LPME)

Οι τεχνικές μικροεκχύλισης δημιουργήθηκαν ως πιο γρήγορες και φθηνές μέθοδοι εκχύλισης, αφού συμβάλλουν στη βελτίωση της απόδοσης κατά την προετοιμασία του δείγματος λόγω της απλότητας τους και του μικρού χρόνου προετοιμασίας. Μπορούν να θεωρηθούν ως μη διεξοδικές μέθοδοι προετοιμασίας του δείγματος, οι οποίες βασίζονται στη χρήση ενός πολύ μικρού όγκου από το εκχυλιστικό μέσο, συγκρινόμενες ως προς τον όγκο του δείγματος^[24].

Με το πέρασ ορισμένων ετών, προτάθηκε στη βιβλιογραφία η μικροεκχύλιση με διαλύτη, γνωστή και ως Μικροεκχύλιση Υγρής Φάσης^[25,26]. Η καινοτομία της LPME τεχνικής συνίσταται στην ελαχιστοποίηση της παραδοσιακής Υγρής – Υγρής Εκχύλισης, με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του λόγου των όγκων της φάσης δέκτη προς τη φάση δότη^[3]. Στην LPME η συγκέντρωση των αναλυτών τοποθετείται σε πολύ μικρό όγκο (μερικά μl) στη φάση του δέκτη μέσω άμεσης επαφής ή μέσω μιας πορώδους μεμβράνης. Η δεύτερη περίπτωση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε σύστημα δύο ή τριών φάσεων^[27]. Στο σύστημα των δύο φάσεων οι αναλύτες εκχυλίζονται από το δείγμα σε οργανικό διαλύτη εμπλουτίζοντας τους πόρους της μεμβράνης. Στο σύστημα τριών φάσεων το pH ρυθμίζεται ανάλογα με τον αναλύτη που χρησιμοποιείται, ο οποίος μπορεί να εκχυλιστεί στον οργανικό διαλύτη που εμπλουτίζει τους πόρους της μεμβράνης και τελικά να μεταφερθεί στο υδατικό διάλυμα του δέκτη μέσα στη μεμβράνη. Το pH ρυθμίζεται έτσι ώστε να παγιδεύει τον αναλύτη στην ιονική του μορφή (πχ. Το pH θα ρυθμιστεί ως βασικό για όξινους αναλύτες). Τα πλεονεκτήματά τους είναι ότι συνδυάζουν ταχύτητα, απλότητα, χαμηλό κόστος και είναι φιλικές προς το περιβάλλον. Επιπλέον, με τις τεχνικές αυτές καθίσταται

πλέον δυνατή η ανάλυση ρυπαντών σε πραγματικά περιβαλλοντικά δείγματα όπου συνήθως απαντούν σε ίχνη.



Εικόνα 2 : LPME μέσω πορώδους μεμβράνης (α) σε σύστημα δύο φάσεων (β) σε σύστημα τριών φάσεων^[3]

1.2.3.3. Εφαρμογές της μικροεκχύλισης υγρής φάσης

(i) Βιοϊατρική

Ένας μεγάλος αριθμός εφαρμογών που χρησιμοποιούν την LPME περιλαμβάνει τον προσδιορισμό αρκετών φαρμάκων για βιολογικά υγρά (αίμα, πλάσμα, ούρα και σάλιο)^[3]. Η μέθοδος της μικροεκχύλισης σε συνδυασμό με την αέρια ή την υγρή χρωματογραφία έχει αποδώσει σε όρια ανίχνευσης της τάξης μg/l. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην LPME παρέχουν άριστη απομάκρυνση του δείγματος μέσω απόκλισης μακρομορίων και άλλων συστατικών από τη φάση του δέκτη, τα οποία μπορούν να επέμβουν στην ανάλυση.

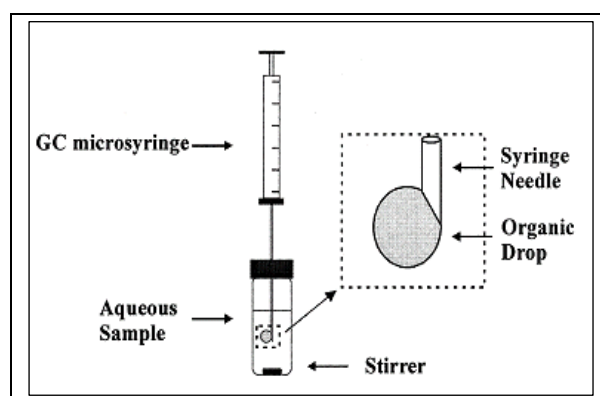
(ii) Περιβαλλοντική ανάλυση και ανάλυση τροφίμων

Η εφαρμογή της LPME στον προσδιορισμό ρυπαντών είχε ως αποτέλεσμα παράγοντες εμπλουτισμού των αναλυτών σε χαμηλή συγκέντρωση καθώς και επιλεκτικότητα λόγω της φύσης της ίνας, αποτρέποντας έτσι την εκχύλιση μεγάλων μορίων. Η LPME πρόσφατα εφαρμόστηκε στον τομέα της ανάλυσης τροφίμων και πιο συγκεκριμένα στον προσδιορισμό φυτοκτόνων στο αγελαδινό γάλα^[3].

1.2.3.4. Μικροεκχύλιση Μονής Σταγόνας

(Single-Drop Microextraction - SDME)

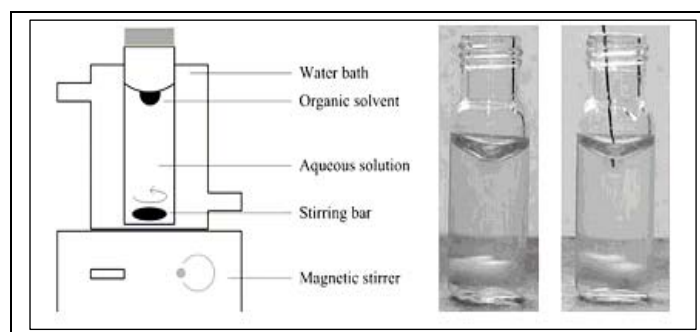
Η μικροεκχύλιση μονής σταγόνας είναι ουσιαστικά μια εξελιγμένη προσέγγιση της υγρής μικροεκχύλισης. Στη συγκεκριμένη μέθοδο μία σταγόνα από ένα μη υδατοδιαλυτό οργανικό διαλύτη αιωρείται από τη μύτη μίας μικροσύριγγας^[23] (εικόνα 2).



Εικόνα 3 : Μικροεκχύλιση μονής σταγόνας (SDME)^[18]

Χαρακτηριστική είναι η χρήση της για την εκχύλιση των κύριων ενώσεων από υδατικά διαλύματα. Η πρώτη προσέγγιση που ακολούθησε τη μέθοδο αυτή ονομάστηκε Μικροεκχύλιση Απευθείας Αιωρούμενου Σταγονιδίου (Directly Suspended Droplet Microextraction, DSDME)^[28] (εικόνα 4), όπου η ανάδευση του μίγματος που περιείχε το υδατικό δείγμα και την

οργανική φάση δέκτη παρήγαγε ένα συμμετρικά περιστρεφόμενο πεδίο γύρω από τον συμμετρικό άξονα του μικροσταγονιδίου. Παρά το γεγονός ότι η μικροσταγόνα αφέθηκε ελεύθερη, εξακολουθούσε να υφίσταται στη μορφή μονής σταγόνας. Με την παρέλευση ενός προκαθορισμένου χρονικού διαστήματος η οργανική φάση δέκτης απομακρύνθηκε με τη βοήθεια μικροσύριγγας και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση. Σε μια πιο πρόσφατη εργασία, σε μίγμα αποτελούμενο από δείγμα ουρίνης και τολουολίου σαν φάση δέκτης εφαρμόστηκε φυγοκέντρωση αντί ανάδευσης, επιτρέποντας έτσι τη διάχυση των κύριων ενώσεων εντός της οργανικής φάσης δέκτη ^[29]. Πρόσφατα προτάθηκε μια ελαφριά παραλλαγή της πιο πάνω μεθόδου υπό την ονομασία Υγρή – Υγρή Μικροεκχύλιση Διασποράς (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME) ^[30]. Σε αυτή την παραλλαγή ένας διαλύτης διασκορπίσματος μη υδατοδιαλυτός καθώς και μία οργανική φάση, εγχύθηκαν στο διάλυμα δημιουργώντας ένα θολό διάλυμα. Στη συνέχεια το μίγμα υπέστη φυγοκέντρωση με αποτέλεσμα τα διασπαρμένα σωματίδια να καθιζάνουν στη βάση του κωνικού φιαλιδίου. Εν κατακλείδι, μια νέα μέθοδος μικροεκχύλισης μονής σταγόνας προτάθηκε, βασισμένη στη στερεοποίηση της επιπλέουσας μικροσταγόνας ^[30]. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, το φιαλίδιο που περιέχει το υδατικό δείγμα και την οργανική μικροσταγόνα, μεταφέρεται σε λουτρό πάγου. Με το πέρασμα ενός σύντομου χρονικού διαστήματος, ο οργανικός διαλύτης στερεοποιείται και μεταφέρεται σε ένα μικρό κωνικό φιαλίδιο με τη βοήθεια μιας μικρής σπάτουλας. Τελικώς, ο στερεοποιημένος οργανικός διαλύτης τήκεται ταχύτατα υπό θερμοκρασία δωματίου και ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα λαμβάνεται προς ανάλυση.



Εικόνα 4 : Μικροεκχύλιση Απευθείας Αιωρούμενου Σταγονιδίου^[28]

Η διαδικασία της μικρό-εκχύλισης πραγματοποιείται εξαιτίας της διαφοράς συγκέντρωσης των αναλυτών μεταξύ των δύο μη αναμίξιμων υγρών φάσεων (υδατικής και οργανικής). Η μεταφορά μάζας των αναλυτών από την υδατική φάση (δείγμα) στην οργανική φάση (μικροσταγόνα) συνεχίζεται έως ότου επιτευχθεί η θερμοδυναμική ισορροπία ή σταματήσει η εκχύλιση^[3].

Εάν συμβολίσουμε ως C_A^{aq} και C_A^o τη συγκέντρωση των αναλυτών στην υδατική και στην οργανική φάση (μικροσταγόνα) αντίστοιχα τότε για το δείγμα πριν και μετά την προσθήκη της οργανικής φάσης θα ισχύει :

$$C_A^{aq} * V^{aq} + C_A^o * V^o = C_{A,0}^{aq} * V^{aq} \quad (12)$$

Όπου C_A^{aq} και C_A^o είναι η συγκέντρωση του αναλύτη στο υδατικό διάλυμα και στη μικροσταγόνα αντίστοιχα, $C_{A,0}^{aq}$ είναι η αρχική συγκέντρωση του αναλύτη στο υδατικό διάλυμα και V^{aq} και V^o είναι ο όγκος του δείγματος και της μικροσταγόνας αντίστοιχα.

Η ισορροπία δυναμικής μάζας του αναλύτη στη μικροσταγόνα δίνεται από τον τύπο:

$$\frac{d(C_A^o V^o)}{dt} = k_{tot}^o A_i [K_A C_A^{aq} - C_A^o] \quad (13)$$

Όπου A_i είναι η οριακή επιφάνεια (επιφάνεια της μικροσταγόνας που αντιστοιχεί σε $(V^o)^{2/3}$), K_A είναι ο συντελεστής συμμετοχής σε ισορροπία, που ισούται με το λόγο $C_A^{o,eq}/C_A^{aq}$, και k_{tot}^o ο συντελεστής μεταφοράς μάζας του αναλύτη ως προς την οργανική φάση.

Ο συντελεστής μεταφοράς μάζας k_{tot}^o δίνεται από τον τύπο :

$$\frac{1}{k_{tot}^o} = \frac{1}{k^o} + \frac{K_A}{k^{aq}} \quad (14)$$

Όπου k^o και k^{aq} οι συντελεστές μεταφοράς μάζας του αναλύτη στην οργανική και υδατική φάση αντίστοιχα.

Αν υποθέσουμε ότι ο όγκος της μικροσταγόνας παραμένει σταθερός, τότε και η A_i θα παραμένει σταθερή. Συνεπώς, από τις εξισώσεις (1) και (2) προκύπτει:

$$C_A^o(t) = C_{A,0}^{o,eq} [1 - e^{-\lambda t}] \quad (15)$$

Όπου $C_{A,0}^{o,eq}$ είναι η συγκέντρωση του αναλύτη στη μικροσταγόνα σε ισορροπία και λ η σταθερά ταχύτητας, και δίνονται από τους τύπους :

$$C_{A,0}^{o,eq} = \frac{K_A C_{A,0}^{aq} V^{aq}}{V^{aq} + K_A V^o} \quad (16) \quad \text{και} \quad \lambda = \frac{k_{tot}^o A_i}{V^o} \left(1 + \frac{K_A V^o}{V^{aq}} \right) \quad (17)$$

Όταν έχουμε συνθήκες ισορροπίας και η οργανική φάση είναι οκτανόλη θα ισχύει ότι $K_A = K_{A,ow} = \frac{C_A^{org}}{C_A^{aq}}$, οπότε και το K_A θα αντικατασταθεί με το $K_{A,ow}$ στις παραπάνω σχέσεις, ενώ το C_A^{aq} θα αναφέρεται σε συνθήκες ισορροπίας ($C_A^{aq} = C_{A,eq}^{aq}$).

Η ισορροπία επιτυγχάνεται ταχύτερα όταν η τιμή της σταθεράς ταχύτητας, λ , είναι μεγαλύτερη, δηλαδή όσο μεγαλύτερος είναι ο όγκος του δείγματος, V^{aq} , ή η ολική περιοχή διεπιφάνειας, A_i , ή όσο ο όγκος της οργανικής φάσης, V^o , είναι μικρότερος^[29].

Τα παραπάνω εξαρτώνται άμεσα από την ανάδευση, κατά την οποία σχηματίζεται μια δίνη. Το μέγεθος και το σχήμα της δίνης εξαρτάται από την περιστροφική ταχύτητα του αναδευτήρα. Σε υψηλές ταχύτητες προκαλείται η θρυμματίση της σταγόνας σε μικρότερα σταγονίδια στην υδατική φάση, τα οποία έχουν μικρότερη απόσταση διάχυσης και μεγαλύτερη ειδική επιφάνεια, με αποτέλεσμα να οδηγούν τις κύριες ενώσεις προς την ισορροπία γρηγορότερα. Έτσι, αυξάνοντας την ανάδευση η ισορροπία επέρχεται γρηγορότερα.

1.2.3.5. Σύγκριση LPME με SDME

Παρόλο που η SDME είναι μια απλή, φθηνή και γρήγορη τεχνική εκχύλισης, απαιτεί πολύ προσεκτικό χειρισμό, δεδομένου των προβλημάτων αστάθειας της μικροσταγόνας που έχουν αναφερθεί. Η εφαρμογή σε δύσκολα συστήματα απαιτεί ένα επιπλέον βήμα φιλτραρίσματος του δείγματος. Πιο σημαντικό, όμως, είναι να αναφερθεί ότι η ευαισθησία και η ακρίβεια της μεθόδου είναι φτωχή. Αυτό οφείλεται στους μεγάλους χρόνους εκχύλισης και στους γρηγορότερους ρυθμούς ανάδευσης, που δεν συστήνονται, αφού συνήθως καταλήγουν στη διάλυση της σταγόνας.

Στην LPME η οργανική φάση (δέκτης) προστατεύεται από την ίνα και φαίνεται ότι η παρουσία της ίνας επιβραδύνει την διαδικασία διάλυσης του οργανικού διαλύτη στον όγκο του διαλύματος. Ακόμα, η επιφάνεια του συστήματος δύο φάσεων είναι μεγαλύτερη από τη σφαιρική επιφάνεια της SDME μεθόδου. Με την αύξηση της επιφάνειας επαφής ανάμεσα στη φάση του δότη και της

οργανικής φάσης (φάση του δέκτη) αυξάνεται και ο ρυθμός της εκχύλισης του αναλύτη^[28].

1.2.3.6. Προτεινόμενη μέθοδος μικροεκχύλισης:

Μέθοδος μικροεκχύλισης με ελεύθερη σταγόνα

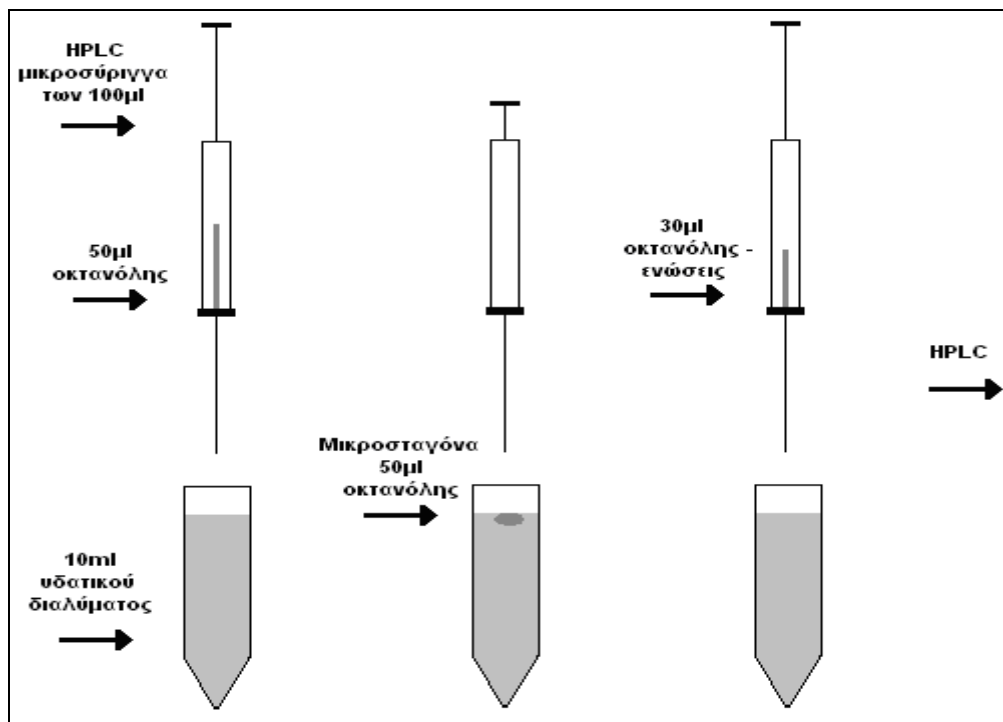
(Free Drop Microextraction - FDME)

Στην παρούσα εργασία αναπτύσσεται η μέθοδος μικροεκχύλισης με ελεύθερη σταγόνα (Free Drop Microextraction = FDME) (εικόνα 5). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή η ουσία εκχυλίζεται από την υδατική φάση κατευθείαν μέσα στην οργανική φάση ως εξής : μία μικροσταγόνα ενός οργανικού διαλύτη μη διαλυτού στο νερό εισάγεται σε υδατικό διάλυμα ορισμένου όγκου. Το υδατικό διάλυμα βρίσκεται σε φυγοκεντρικό φιαλίδιο, το οποίο περιέχει και τις ενώσεις που μελετώνται. Το φιαλίδιο αναδεύεται με τη βοήθεια συσκευής vortex, με αποτέλεσμα η οργανική μικροσταγόνα να διασπάται παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο ταχύτερες κινητικές εκχύλισης των κύριων ενώσεων. Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρείται ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις και να επανασχηματιστεί η οργανική μικροσταγόνα. Με τη χρήση μιας μικροσύριγγας η μικροσταγόνα αποσπάται από το υδατικό διάλυμα και εισάγεται σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Η ιδέα της μικροεκχύλισης με χρήση φυγοκέντρου και μόνο εισάχθηκε από τον Fang et al.^[29]. Γενικά, κατά τη φυγοκέντρωση, δρουν δυο αντίθετες δυνάμεις: η καθίζηση των μορίων λόγω της φυγοκέντρου δύναμης του περιστροφέα και η διάχυση^[27]. Το βήμα της φυγοκέντρωσης κρίθηκε απαραίτητο για την επανάκτηση - επανασχηματισμό της μικροσταγόνας μετά τη γρήγορη ανάδευση του μίγματος επιμολυσμένης υδατικής φάσης και οργανικής φάσης.

Η μέθοδος αυτή είναι γρήγορη και απλή, με μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία. Χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση υδρογονανθράκων, εντομοκτόνων και χλωροφαινολών. Το βασικό πλεονέκτημα της είναι ότι η ισορροπία αποκαθίσταται εντός μερικών λεπτών, αυξάνοντας επομένως την ακρίβεια και

την ευαισθησία, και μειώνοντας ταυτόχρονα το συνολικό χρόνο προετοιμασίας του δείγματος.



Εικόνα 5 : Μικροεκχύλιση με ελεύθερη μικροσταγόνα (FDME)

Η τεχνική της μικροεκχύλισης βασίζεται στην αρχή θερμοδυναμικής ισορροπίας του δείγματος μεταξύ διαφορετικών φάσεων. Για τον προσδιορισμό του K_{ow} το χημικό δυναμικό της ουσίας που χρησιμοποιείται στην φάση του νερού και στην οργανική φάση εκφράζονται ως εξής :

$$\mu_o = \mu_o^\theta + RT \ln \left(\frac{C_o}{C^\theta} \right) \quad (18)$$

$$\mu_w = \mu_w^\theta + RT \ln \left(\frac{C_w}{C^\theta} \right) \quad (19)$$

όπου μ_o , μ_o^θ και μ_w , μ_w^θ είναι τα χημικά δυναμικά των εξεταζόμενων ουσιών και των πρότυπων ουσιών στη φάση της οκτανόλης και του νερού αντίστοιχα. Η διαφορά $\mu_w - \mu_o$ αποτελεί την ελεύθερη μοριακή ενέργεια του διαλύματος ΔG_s .

$$\Delta G_s = \mu_w - \mu_o = \mu_w^\theta + RT \ln\left(\frac{C_w}{C^\theta}\right) - \mu_o^\theta - RT \ln\left(\frac{C_o}{C^\theta}\right) \quad (20)$$

Όταν αρχικά η οργανική ένωση έρχεται σε επαφή με την υδατική φάση το μ_o είναι πολύ μεγαλύτερο από το μ_w . Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η ΔG_s να παίρνει αρνητική τιμή και έτσι οργανικά μόρια από την οργανική φάση (υψηλότερο χημικό δυναμικό) να οδηγούνται στην υδατική φάση (χαμηλότερο χημικό δυναμικό). Έτσι, η τιμή του x_w αυξάνει μέχρι που τα χημικά δυναμικά να εξισωθούν, δηλαδή να επέλθει ισορροπία, όπου θα ισχύει $\mu_w = \mu_o \Leftrightarrow \Delta G_s = 0$.

Όταν τα χημικά δυναμικά των δύο φάσεων θα είναι ίσα μεταξύ τους θα ισχύει :

$$\mu_w = \mu_o, \text{ οπότε } \ln\left(\frac{C_o}{C_w}\right) = (\mu_w^\theta - \mu_o^\theta)/RT \quad (21)$$

Υπό συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης τα μ_w^θ και μ_o^θ έχουν συγκεκριμένες τιμές, και συνεπώς το $\ln\left(\frac{C_o}{C_w}\right)$ θα είναι σταθερό κάτω από σταθερές συνθήκες, οπότε και θα ισχύει $\frac{C_o}{C_w} = K_{ow}$, όπου K_{ow} είναι ο συντελεστής κατανομής και είναι επίσης σταθερός για σταθερή θερμοκρασία και πίεση^[31].

Θεωρία φιλμ (film theory)

Μοριακή διάχυση είναι η διαδικασία κατά την οποία μόρια τυχαία αναμεμιγμένα κινούνται από περιοχές υψηλής συγκέντρωσης σε περιοχές χαμηλής συγκέντρωσης. Αναμένεται ότι η ποσότητα που θα μεταφερθεί εξαρτάται από τη διαφορά συγκέντρωσης και την περιοχή διεπιφάνειας.

$$\left(\frac{\text{ρυθμός μεταφοράς}}{\text{μάζας}}\right) = k * \left(\frac{\text{περιοχή}}{\text{διεπιφάνειας}}\right) * (\text{διαφορά συγκέντρωσης})$$

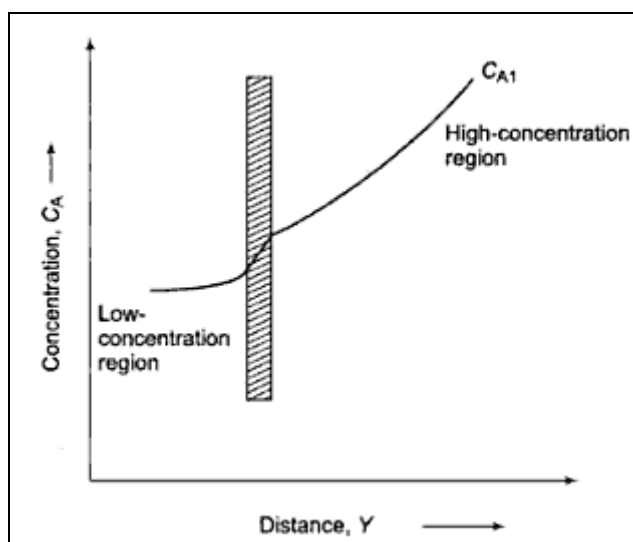
όπου k είναι ο συντελεστής μεταφοράς μάζας. Διαιρώντας και τα δύο μέλη της εξίσωσης με την περιοχή προκύπτει :

$$N_L = k * (C_{Li} - C_L) \quad (22)$$

όπου N_L είναι η ροή στη διεπιφάνεια και C_{Li} και C_L οι συγκεντρώσεις στη διεπιφάνεια και στην κύρια μάζα διαλύματος αντίστοιχα. Η ροή N_L συμπεριλαμβάνει τη διάχυση και τη μεταφορά και αφορά τη ροή στην περιοχή διεπιφάνειας. Η συγκέντρωση C_{Li} είναι στη διεπιφάνεια αλλά στο ίδιο υγρό με τη συγκέντρωση της κύριας μάζας του διαλύματος, C_L . Η C_{Li} είναι συνήθως σε ισορροπία με τη συγκέντρωση κατά μήκος της διεπιφάνειας σε μία δεύτερη προσκείμενη υγρή φάση.

Η εξίσωση (22) ουσιαστικά δείχνει ότι αν η διαφορά συγκέντρωσης διπλασιαστεί τότε θα διπλασιαστεί και η ροή. Αν όμως διπλασιαστεί η περιοχή τότε θα διπλασιαστεί και η ολική ποσότητα μεταφοράς μάζας, αλλά η ροή ανά περιοχή δεν θα αλλάξει.

Η ανάδευση βοηθά ώστε να έρθουν σε ισορροπία οι διαφορές συγκέντρωσης μέσα στην κύρια μάζα της μίας φάσης, αλλά αυτό δεν επηρεάζει την κίνηση της διαλυόμενης ουσίας ανάμεσα στο λεπτό φιλμ που διαχωρίζει τις δύο φάσεις. Η γρήγορη ανάδευση βοηθά στο να γίνει το φιλμ πιο λεπτό αλλά δεν το εξαλείφει. Η μεταφορά μάζας λαμβάνει χώρα μέσω της περιοχής διεπιφάνειας^[32].



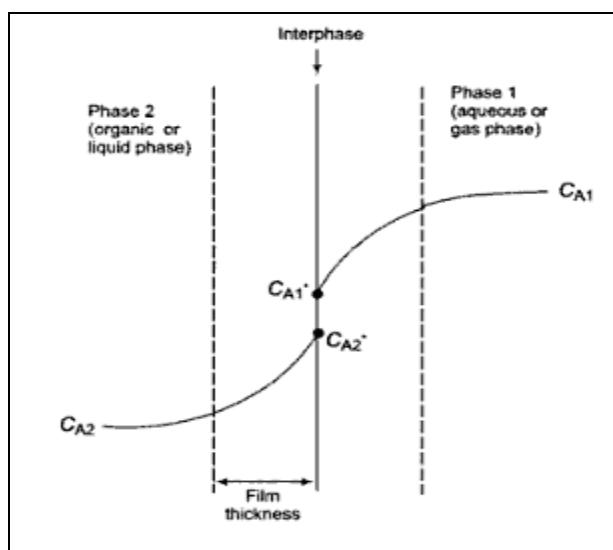
Εικόνα 6 : Σχηματική αναπαράσταση της μοριακής διάχυσης

Η παροχή μάζας (J_A) δίνεται διαιρώντας το ρυθμό μεταφοράς μάζας (N'_A) με την περιοχή (A) :

$$J_A = \frac{N'_A}{A} = -D_{AB} * \frac{dC_A}{dY} \quad (23)$$

όπου D_{AB} ο συντελεστής διάχυσης της ουσίας A μέσα στην κύρια μάζα της ουσίας B (σε m^2/s), Y είναι η απόσταση που μετράται από τη ζώνη μικρότερης συγκέντρωσης στη ζώνη μεγαλύτερης συγκέντρωσης, δηλαδή η κατεύθυνση της Y είναι αντίθετη στην κατεύθυνση του ρυθμού μεταφοράς μάζας. Το αρνητικό πρόσημο δηλώνει ότι όσο το Y αυξάνει το C_A μειώνεται. Η εξίσωση αποτελεί το νόμο του Fick για διάχυση.

Η θεωρία φιλμ (Film Theory) προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Whitman, 1923^[32], βασισμένη στην ιδέα του «στρώματος διάχυσης» του Nernst, 1904^[32]. Η θεωρία αυτή περιγράφει ότι ένα στάσιμο φιλμ σταθερού πάχους, δ, υπάρχει στο όριο μεταξύ των δύο φάσεων. Γενικά, δεν θα παρουσιαστεί αλλαγή συγκέντρωσης μέσα στη φάση αφού μπορεί έρθει σε ισορροπία μέσω ανάδευσης. Όμως, όσο έντονη και αν είναι η ανάδευση το φιλμ διάχυσης δεν εξαλείφεται, και στην ουσία εμποδίζει τη μεταφορά μάζας να πραγματοποιηθεί. Σε αυτό το φιλμ η μεταφορά μάζας γίνεται μέσω διάχυσης μόνο^[32].



Εικόνα 7 : Σχηματική αναπαράσταση της θεωρίας φιλμ (film theory)

Στο σχήμα αυτό φαίνεται η περιοχή διεπιφάνειας, που διαχωρίζει τις δύο μη-αναμίξιμες φάσεις, οι οποίες μπορεί να είναι αέρια και υγρή ή οργανική και υδατική φάση (όπως και στη περίπτωση που μελετάται). Η C_{A1} στη φάση 1

μεταπίπτει σε C_{A1}^* μέσα στο φιλμ. Όμοια η συγκέντρωση στη φάση 2 θα είναι C_{A2} η οποία μεταπίπτει από C_{A2}^* στη διεπιφάνεια. Οι C_{A1}^* και C_{A2}^* είναι οι διαλυτότητες της διαλυόμενης ουσίας σε ισορροπία στις δύο φάσεις. Για την παρούσα μελέτη η φάση 1 αντιστοιχεί στην οργανική φάση – φάση οκτανόλης και η φάση 2 στην υδατική φάση – φάση νερού. Η θεωρία φιλμ (Film theory) προτείνει ότι ο συντελεστής μεταφοράς μάζας k_L δίνεται από τον τύπο (Danckwerts, 1970)^[32]:

$$k_L = \frac{D_{AB}}{\delta} \quad (24)$$

όπου δ είναι το πάχος του φιλμ και αντιπροσωπεύει τα θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά του συστήματος, τις φυσικές ιδιότητες του υγρού και την ανάδευση. Ο ρυθμός μεταφοράς μάζας του A στην υγρή και στην οργανική φάση αντίστοιχα είναι:

$$N_{AL} = k_L \cdot a \cdot (C_{AL}^* - C_{AL}) \quad (25) \quad \text{και} \quad N_{AO} = k_O \cdot a \cdot (C_{AO} - C_{AO}^*) \quad (26)$$

Εδώ, τα C_{AO}^* και C_{AL}^* είναι οι συγκεντρώσεις της διαλυόμενης ουσίας σε ισορροπία σε ισορροπία στην οργανική και υδατική φάση αντίστοιχα^[34]. Ο

λόγος τους ισούται με τον συντελεστή κατανομής K_{ow} : $\frac{C_{AO}^*}{C_{AL}^*} = K_{ow} \quad (27).$

2. Πειραματικό Μέρος

2.1. Αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω χημικά για την προετοιμασία των δειγμάτων:

- Ναφθαλένιο με βαθμό καθαρότητας 99% και μοριακό βάρος 128 g/mol του οίκου Aldrich
- Dichlorvos με βαθμό καθαρότητας 98.6% και μοριακό βάρος 221 g/mol του οίκου Pestanal
- Simazine με βαθμό καθαρότητας 99.9% και μοριακό βάρος 201.66 g/mol του οίκου Pestanal
- Hydroquinone με βαθμό καθαρότητας 99% και μοριακό βάρος 110.11 g/mol του οίκου Pestanal
- 2.6-διχλωροφαινόλη με βαθμό καθαρότητας 99.9% και μοριακό βάρος 163 g/mol του οίκου Pestanal
- 2.4-διχλωροφαινόλη με βαθμό καθαρότητας 99.4% και μοριακό βάρος 163 g/mol του οίκου Pestanal
- 2.4.6-τριχλωροφαινόλη με βαθμό καθαρότητας 99.5% και μοριακό βάρος 197.5 g/mol του οίκου Supelco
- Μεθανόλη με βαθμό καθαρότητας του οίκου Aldrich για Υγρή Χρωματογραφία
- Οκτανόλη του οίκου Riedel-de-Häen και του οίκου Aldrich

Χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό από σύστημα καθαρισμού ύδατος (EASYpure[®]RF) το οποίο προμηθεύτηκε από την Barnstead/Thermolyne Corporation (Dubuque, IO, USA) για την καθημερινή παρασκευή των διαλυμάτων.

2.2. Όργανα – Συσκευές

- Γυάλινο φιαλίδιο των 22ml με βιδωτό πώμα

- Γυάλινο φιαλίδιο των 7ml με βιδωτό πώμα
- Γυάλινο φυγοκεντρικό φιαλίδιο των 10ml
- Hamilton HPLC μικροσύριγγα των 100μl, μοντέλο SNR700
- HPLC σύστημα της Shimadzu
- Αναδευτήρας τύπου vortex (Reax Control, Heidolph, Germany)
- Φυγόκεντρος (Labofuge 400 Heraeus Kendro Laboratory Products, Germany)

2.3. Αναλύσεις με HPLC

Για την ανάλυση των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε σύστημα HPLC της Shimadzu. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Agilent Zorbex Eclipse XDB – C₁₈ Analytical 4.6*150mm 5-Micron. Η κινητή φάση είναι μίγμα σε αναλογία 85:15 μεθανόλη:νερό. Ο όγκος του δείγματος προς ανάλυση ήταν 30μl και η ανίχνευση επιτεύχθηκε με ανιχνευτή UV σε μήκος κύματος 220nm. Η θερμοκρασία του φούρνου ήταν 27°C, ο χρόνος ανάλυσης 5min και η ροή 0.8 ml/min.

2.4. Προετοιμασία δειγμάτων για εκχύλιση

Αρχικά, οκτανόλη και νερό αναμιγνύονταν για 10 λεπτά σε φιάλη διαχωρισμού. Το μίγμα αφηνόταν σε κατάσταση ηρεμίας για 24 ώρες και διαχωρίζονταν έπειτα με τη χρήση της φιάλης διαχωρισμού. Με τον τρόπο αυτό, το νερό που προέκυπτε ήταν κορεσμένο σε οκτανόλη και η οκτανόλη κορεσμένη σε νερό αντίστοιχα. 10ml νερού (κορεσμένο σε οκτανόλη) τοποθετούνταν σε φυγοκεντρικό φιαλίδιο, ακολουθούσε η προσθήκη της κάθε ουσίας σε γνωστές συγκεντρώσεις και έπειτα η προσθήκη 50μl οκτανόλης. Το μίγμα αναδευόταν με τη βοήθεια vortex αναδευτήρα για 2min σε 2500rpm, ακολουθούσε φυγοκέντρηση για 2min σε 3500rpm και έπειτα συλλογή 30μl από την οκτανολική φάση που χρησιμοποιούνταν για ανάλυση στην HPLC.

3. Αποτελέσματα – Συμπεράσματα

3.1. Υπολογισμός του K_{ow}

Βήμα 1 : Καμπύλη γραμμικότητας

Αρχικά κατασκευάστηκε καμπύλη γραμμικότητας για την κάθε ουσία στη φάση της οκτανόλης (Παράρτημα Ι).

Βήμα 2 : Διαδικασία εκχύλισης

Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.4. Χρησιμοποιήθηκαν έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις για την κάθε ουσία, σε κάθε μια από τις οποίες αντιστοιχούσε μια περιοχή.

Βήμα 3 : Υπολογισμός συγκέντρωσης ουσίας στη φάση της οκτανόλης

Από την εξίσωση των διαγραμμάτων της γραμμικότητας και σύμφωνα με την εκάστοτε συγκέντρωση της κάθε ουσίας και των αντίστοιχων τιμών της περιοχής, υπολογίζεται αρχικά η συγκέντρωση της ουσίας στη φάση της οκτανόλης, όπως φαίνεται και από τον τύπο :

$$y = ax + b \Leftrightarrow A = aC + b \Leftrightarrow C = \frac{A-b}{a} \quad (28) ,$$

όπου C είναι η συγκέντρωση της ουσίας στη φάση της οκτανόλης, A είναι η περιοχή που μετρήθηκε μετά την εκχύλιση και a,b συντελεστές.

Αντικαθιστώντας στην εξίσωση (28) τις τιμές των περιοχών που βρέθηκαν μετά την εκχύλιση υπολογίζεται η συγκέντρωση της ουσίας στην οκτανόλη στην ισορροπία για τις διάφορες συγκεντρώσεις της ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν.

Βήμα 4 : Υπολογισμός συγκέντρωσης ουσίας στη φάση του νερού

Για να υπολογιστεί η συγκέντρωση του νερού χρησιμοποιήθηκε ο τύπος :

$$C_w = \frac{n_w}{V_w} \Leftrightarrow C_w = \frac{n_{total} - n_{oc}}{V_w} \quad (29) ,$$

όπου C_w η συγκέντρωση της ουσίας στο νερό, n_{total} τα ολικά mol, n_w τα mol της ουσίας στο νερό, n_{oc} τα mol της ουσίας στην οκτανόλη και V_w ο όγκος του νερού.

Στην εξίσωση (29) τα ολικά mol ισούνται με $n_{total} = C_{\delta\alpha\lambda} * V_{\delta\alpha\lambda}$ (30) (με $V_{\delta\alpha\lambda} = 10\text{ml}$), όπου $C_{\delta\alpha\lambda}$ η αρχική συγκέντρωση του υδατικού διαλύματος και $V_{\delta\alpha\lambda}$ ο όγκος του διαλύματος, τα mol της ουσίας στην οκτανόλη με $n_{oc} = C_{oc} * V_{oc}$ (31) (με $V_{oc} = 50\mu\text{l}$), όπου C_{oc} η συγκέντρωση της ουσίας στην οκτανόλη και V_{oc} ο όγκος της οκτανόλης και τέλος ο όγκος του νερού ισούται με $V_w = 10\text{ml}$ (32).

Βήμα 5 : Εύρεση του K_{ow}

Τέλος, για την εύρεση του K_{ow} υπολογίζεται ο λόγος της συγκέντρωσης της ουσίας στη φάση της οκτανόλης προς τη συγκέντρωση της ουσίας στη φάση του νερού ($K_{ow} = C_{oc} / C_w$) και υπολογίζεται το $\log K_{ow}$.

3.2. Αποτελέσματα - Συμπεράσματα

Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται τα αποτελέσματα για κάθε μια από τις ουσίες. Οι αριθμοί 1 και 2 αναφέρονται στην πρώτη και δεύτερη δοκιμή που πραγματοποιήθηκε, αντίστοιχα.

3.2.1. Ουσία Hydroquinone

Σύμφωνα με την εξίσωση $y = 6236.5x + 53667$ του διαγράμματος της γραμμικότητας (διάγραμμα 1, παράρτημα Ι) και τις εξισώσεις (21) έως (24) υπολογίζονται τα αποτελέσματα του παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 2 : Αποτελέσματα εκχύλισης για την ουσία Hydroquinone

Συγκέντρωση (μM)	Περιοχή (mVs)		Συγκέντρωση ουσίας στην οκτανόλη (μM)		Ολικά mole ουσίας στο διάλυμα (μmol)	Mole ουσίας στη φάση της οκτανόλης (μmol)		Mole ουσίας στη φάση του νερού (μmol)		Συγκέντρωση ουσίας στο νερό (μmol)		logKow			Τυπική απόκλιση τιμών του logKow
	1	2	1	2		1	2	1	2	1	2	1	2	Μέσος όρος	
25	515252	534174	0.07	0.08	250	3.70	3.85	246.30	246.15	0.025	0.025	0.48	0.50	0.49	0.013
50	1031092	1031794	0.16	0.16	500	7.84	7.84	492.16	492.16	0.049	0.049	0.50	0.50	0.50	0.000
125	2597834	2690952	0.41	0.42	1250	20.40	21.14	1229.60	1228.86	0.123	0.123	0.52	0.54	0.53	0.011
250	5106684	5171121	0.81	0.82	2500	40.51	41.03	2459.49	2458.97	0.246	0.246	0.52	0.52	0.52	0.004
375	7446591	7504869	1.19	1.19	3750	59.27	59.74	3690.73	3690.26	0.369	0.369	0.51	0.51	0.51	0.002
500	8907125	8981790	1.42	1.43	5000	70.98	71.58	4929.02	4928.42	0.493	0.493	0.46	0.46	0.46	0.003

3.2.2. Ουσία Dichlorvos

Σύμφωνα με την εξίσωση $y = 1620,4x + 23391$ του διαγράμματος της γραμμικότητας (διάγραμμα 2, παράρτημα Ι) και τις εξισώσεις (21) έως (24) υπολογίζονται τα αποτελέσματα του παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 3 : Αποτελέσματα εκχύλισης για την ουσία Dichlorvos

Συγκέντρωση (μM)	Περιοχή (mVs)		Συγκέντρωση ουσίας στην οκτανόλη (μM)		Ολικά mole ουσίας στο διάλυμα (μmol)	Mole ουσίας στη φάση της οκτανόλης (μmol)		Mole ουσίας στη φάση του νερού (μmol)		Συγκέντρωση ουσίας στο νερό (μmol)		logKow			Τυπική απόκλιση τιμών του logKow
	1	2	1	2		1	2	1	2	1	2	1	2	Μέσος όρος	
5	203034	204478	0.11	0.11	50	5.67	5.71	44.33	44.29	0.004	0.004	1.41	1.41	1.41	0.003
10	420576	413974	0.25	0.24	100	12.40	12.20	87.60	87.80	0.009	0.009	1.45	1.44	1.45	0.006
20	862954	848723	0.52	0.51	200	26.08	25.64	173.92	174.36	0.017	0.017	1.48	1.47	1.48	0.006
30	1285892	1290019	0.78	0.79	300	39.17	39.30	260.83	260.70	0.026	0.026	1.48	1.48	1.48	0.001
40	1738194	1698092	1.06	1.04	400	53.16	51.92	346.84	348.08	0.035	0.035	1.49	1.47	1.48	0.008
50	2142845	2109382	1.31	1.29	500	65.68	64.64	434.32	435.36	0.043	0.044	1.48	1.47	1.48	0.006

3.2.3. Ουσία Simazine

Σύμφωνα με την εξίσωση $y = 30456x + 455076$ του διαγράμματος της γραμμικότητας (διάγραμμα 3, παράρτημα Ι) και τις εξισώσεις (21) έως (24) υπολογίζονται τα αποτελέσματα του παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 4 : Αποτελέσματα εκχύλισης για την ουσία Simazine

Συγκέντρωση (nM)	Περιοχή (mVs)		Συγκέντρωση ουσίας στην οκτανόλη (μM)		Ολικά mole ουσίας στο διάλυμα (pmol)	Mole ουσίας στη φάση της οκτανόλης (pmol)		Mole ουσίας στη φάση του νερού (pmol)		Συγκέντρωση ουσίας στο νερό (pmol)		logKow			Τυπική απόκλιση τιμών του logKow
	1	2	1	2		1	2	1	2	1	2	1	2	Μέσος όρος	
250	915242	918674	15.11	15.22	2500	755.45	761.09	1744.55	1738.91	0.174	0.174	1.94	1.94	1.94	0.003
500	1678712	1711044	40.18	41.24	5000	2008.84	2061.92	2991.16	2938.08	0.299	0.294	2.13	2.15	2.14	0.014
1000	3224043	3196210	90.92	90.00	10000	4545.81	4500.12	5454.19	5499.88	0.545	0.550	2.22	2.21	2.22	0.006
1500	4626369	4721328	136.96	140.08	15000	6848.01	7003.90	8151.99	7996.10	0.815	0.800	2.23	2.24	2.24	0.013
2000	6070170	5857755	184.37	177.39	20000	9218.29	8869.57	10781.71	11130.43	1.078	1.113	2.23	2.20	2.22	0.022
2500	7212060	7329476	221.86	225.71	25000	11092.93	11285.69	13907.07	13714.31	1.391	1.371	2.20	2.22	2.21	0.010

3.2.4. Ουσία 2.6-dichlorophenol

Σύμφωνα με την εξίσωση $y = 8347.2x + 28205$ του διαγράμματος της γραμμικότητας (διάγραμμα 4, παράρτημα Ι) και τις εξισώσεις (21) έως (24) υπολογίζονται τα αποτελέσματα του παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 5 : Αποτελέσματα εκχύλισης για την ουσία 2.6-dichlorophenol

Συγκέντρωση (nM)	Περιοχή (mVs)		Συγκέντρωση ουσίας στην οκτανόλη (μM)		Ολικά mole ουσίας στο διάλυμα (μmol)	Mole ουσίας στη φάση της οκτανόλης (μmol)		Mole ουσίας στη φάση του νερού (μmol)		Συγκέντρωση ουσίας στο νερό (μmol)		logKow			Τυπική απόκλιση τιμών του logKow
	1	2	1	2		1	2	1	2	1	2	1	2	Μέσος όρος	
500	532103	523732	67.12	66.12	5000	3356.25	3306.10	1643.75	1693.90	0.164	0.169	2.61	2.59	2.60	0.014
1000	1315443	1289468	160.97	157.86	10000	8048.45	7892.86	1951.55	2107.14	0.195	0.211	2.92	2.87	2.90	0.030
2500	2438016	2708861	295.45	327.90	25000	14772.66	16395.02	10227.34	8604.98	1.023	0.860	2.46	2.58	2.52	0.085
5000	5771643	5400929	694.82	650.41	50000	34741.07	32520.50	15258.93	17479.50	1.526	1.748	2.66	2.57	2.62	0.062
7500	9742522	8902422	1170.53	1069.89	75000	58526.63	53494.43	16473.37	21505.57	1.647	2.151	2.85	2.70	2.78	0.109
10000	12180497	11750526	1462.60	1411.09	100000	73130.09	70554.56	26869.91	29445.44	2.687	2.945	2.74	2.68	2.71	0.039

3.2.5. Ουσία 2.4-dichlorophenol

Σύμφωνα με την εξίσωση $y = 8855x + 709735$ του διαγράμματος της γραμμικότητας (διάγραμμα 5, παράρτημα Ι) και τις εξισώσεις (21) έως (24) υπολογίζονται τα αποτελέσματα του παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 6 : Αποτελέσματα εκχύλισης για την ουσία 2.4-dichlorophenol

Συγκέντρωση (nM)	Περιοχή (mVs)		Συγκέντρωση ουσίας στην οκτανόλη (μM)		Ολικά mole ουσίας στο διάλυμα (μmol)	Mole ουσίας στη φάση της οκτανόλης (μmol)		Mole ουσίας στη φάση του νερού (μmol)		Συγκέντρωση ουσίας στο νερό (μmol)		logKow			Τυπική απόκλιση τιμών του logKow
	1	2	1	2		1	2	1	2	1	2	1	2	Μέσος όρος	
500	1426377	1411758	79.46	77.84	5000	3973.10	3892.07	1026.90	1107.93	0.103	0.111	2.89	2.85	2.87	0.030
1000	2395796	2381409	186.93	185.33	10000	9346.31	9266.57	653.69	733.43	0.065	0.073	3.46	3.40	3.43	0.038
2000	3866943	3958919	350.01	360.21	20000	17500.46	18010.26	2499.54	1989.74	0.250	0.199	3.15	3.26	3.21	0.079
3000	5638936	5422218	546.44	522.42	30000	27322.11	26120.90	2677.89	3879.10	0.268	0.388	3.31	3.13	3.22	0.128
4000	7385358	7664601	740.04	771.00	40000	37002.03	38549.79	2997.97	1450.21	0.300	0.145	3.39	3.73	3.56	0.236
5000	8493427	8476607	862.87	861.01	50000	43143.74	43050.51	6856.26	6949.49	0.686	0.695	3.10	3.09	3.10	0.005

3.2.6. Ουσία Naphthalene

Σύμφωνα με την εξίσωση $y = 56765x + 2400.3$ του διαγράμματος της γραμμικότητας (διάγραμμα 6, παράρτημα Ι) και τις εξισώσεις (21) έως (24) υπολογίζονται τα αποτελέσματα του παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 7 : Αποτελέσματα εκχύλισης για την ουσία Naphthalene

Συγκέντρωση (nM)	Περιοχή (mVs)		Συγκέντρωση ουσίας στην οκτανόλη (μM)		Ολικά mole ουσίας στο διάλυμα (pmol)	Mole ουσίας στη φάση της οκτανόλης (pmol)		Mole ουσίας στη φάση του νερού (pmol)		Συγκέντρωση ουσίας στο νερό (pmol)		logKow			Τυπική απόκλιση τιμών του logKow
	1	2	1	2		1	2	1	2	1	2	1	2	Μέσος όρος	
250	2605806	2693644	45.86	47.41	2500	2293.15	2370.52	206.85	129.48	0.021	0.013	3.35	3.56	3.45	0.154
500	5413052	5338945	95.32	94.01	5000	4765.86	4700.58	234.14	299.42	0.023	0.030	3.61	3.50	3.56	0.080
800	8419381	8357825	148.28	147.19	8000	7413.91	7359.69	586.09	640.31	0.059	0.064	3.40	3.36	3.38	0.029
1000	10477924	10999693	184.54	193.73	10000	9227.14	9686.73	772.86	313.27	0.077	0.031	3.38	3.79	3.56	0.292
1200	12268713	13316772	216.09	234.55	12000	10804.52	11727.68	1195.48	272.32	0.120	0.027	3.26	3.94	3.60	0.479
1400	14291960	15285181	251.73	269.23	14000	12586.65	13461.51	1413.35	538.49	0.141	0.054	3.25	3.70	3.48	0.317

3.2.7. Ουσία 2.4.6-trichlorophenol

Σύμφωνα με την εξίσωση $y = 17652x + 704925$ του διαγράμματος της γραμμικότητας (διάγραμμα 7, παράρτημα Ι) και τις εξισώσεις (2) έως (5) υπολογίζονται τα αποτελέσματα του παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 8 : Αποτελέσματα εκχύλισης για την ουσία 2.4.6-trichlorophenol

Συγκέντρωση (nM)	Περιοχή (mVs)		Συγκέντρωση ουσίας στην οκτανόλη (μM)		Ολικά mole ουσίας στο διάλυμα (μmol)	Mole ουσίας στη φάση της οκτανόλης (μmol)		Mole ουσίας στη φάση του νερού (μmol)		Συγκέντρωση ουσίας στο νερό (μmol)		logKow			Τυπική απόκλιση τιμών του logKow
	1	2	1	2		1	2	1	2	1	2	1	2	Μέσος όρος	
500	2281883	2382744	89.33	95.05	5000	4466.71	4752.40	533.29	247.60	0.053	0.025	3.22	3.58	3.40	0.255
1000	4043929	3929021	189.15	182.64	10000	9457.69	9132.21	542.31	867.79	0.054	0.087	3.54	3.32	3.43	0.155
2000	7258133	7509121	371.24	385.46	20000	18561.88	19272.80	1438.12	727.20	0.144	0.073	3.41	3.72	3.57	0.221
3000	10948172	11198585	580.28	594.46	30000	29013.87	29723.16	986.13	276.84	0.099	0.028	3.77	4.33	4.05	0.398
4000	14381949	14802763	774.80	798.64	40000	38740.00	39931.95	1260.00	68.05	0.126	0.007	3.79	5.07	4.43	0.906
5000	17243867	16369746	936.93	887.41	50000	46846.34	44370.41	3153.66	5629.59	0.315	0.563	3.47	3.20	3.34	0.195

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.2.3.5 η εξίσωση που περιγράφει τη διαδικασία της μικροεκχύλισης με ελεύθερη μικροσταγόνα είναι η

$$\ln\left(\frac{C_o}{C_w}\right) = (\mu_w^\theta - \mu_o^\theta)/RT. \text{ Από αυτή συμπεραίνουμε ότι το } \log K_{ow} \text{ εξαρτάται}$$

από το χημικό δυναμικό και τη θερμοκρασία, αλλά είναι ανεξάρτητο της συγκέντρωσης της ουσίας που χρησιμοποιείται. Αυτό αποδεικνύεται και πειραματικά, αφού παρατηρείται ότι στην κάθε ουσία ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικές συγκεντρώσεις το $\log K_{ow}$ παραμένει σταθερό.

Τα αποτελέσματα φαίνεται να συμφωνούν αρκετά με τις τιμές του $\log K_{ow}$ που παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 9 : Σύγκριση αποτελεσμάτων του πειράματος με τα βιβλιογραφικά

Ουσία	Πειραματική τιμή $\log K_{ow}$		Βιβλιογραφική τιμή $\log K_{ow}$ ^[1]
	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	
Hydroquinone	0.50	±0.005	0.59
Dichlorvos	1.46	±0.005	1.45
Simazine	2.16	±0.011	2.18
2.6-διχλωροφαινόλη	2.69	±0.057	2.75
2.4-διαχλωροφαινόλη	3.23	±0.086	3.08
Ναφθαλένιο	3.50	±0.225	3.36
2.4.6-τριχλωροφαινόλη	3.70	±0.355	3.75

Οι ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν επιλέχθηκαν ανάλογα με το πόσο υδρόφιλες/υδρόφοβες είναι. Στόχος ήταν η επίτευξη μεγάλου εύρους τιμών K_{ow} έτσι ώστε να εξεταστεί η συμπεριφορά των πιο υδρόφιλων και των πιο υδρόφοβων ουσιών. Η πιο υδρόφιλη ουσία είναι το hydroquinone με $\log K_{ow}$ 0.5 και η πιο υδρόφοβη ουσία είναι το 2.4.6-trichlorophenol με $\log K_{ow}$ 3.70.

Ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ο μικρός χρόνος εκχύλισης. Εφαρμόζοντας έντονη ανάδευση στο δείγμα μειώνεται η διάχυση και βελτιώνεται η αποδοτικότητα της εκχύλισης, με αποτέλεσμα να μειώνεται και ο χρόνος εκχύλισης. Έτσι, δεν υπάρχει επίσης η δημιουργία

γαλακτώματος στη διεπιφάνεια ανάμεσα στις δύο φάσεις, και έτσι αυτές μπορούν να διαχωριστούν εντελώς πολύ γρήγορα.

Η μείωση του χρόνου εκχύλισης βασίζεται στη θεωρία των δύο φιλμ του Whitman^[31], όπου η μεταφορά μάζας συμβαίνει μόνο μέσω διάχυσης σύμφωνα με τα φιλμ διάχυσης του Nernst (Nernst diffusion films). Σε σταθερές συνθήκες ο συντελεστής μεταφοράς μάζας της υδατικής φάσης δίνεται από τον τύπο $k_{aq} = D_{aq} / \delta_{aq}$, όπου D_{aq} είναι ο συντελεστής διάχυσης στην υδατική φάση, δ_{aq} το πάχος του φιλμ και k_{aq} ο συντελεστής μεταφοράς μάζας. Σε γρηγορότερους ρυθμούς ανάδευσης το πάχος του φιλμ διάχυσης (diffusion film) μειώνεται προκαλώντας αύξηση στο συντελεστή μεταφοράς μάζας. Κατά αυτόν τον τρόπο προκαλείται και αύξηση στην ταχύτητα εκχύλισης των ουσιών που χρησιμοποιούνται.

Η επίτευξη της ισορροπίας σε τόσο μικρό χρονικό διάστημα είναι και το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου απέναντι σε άλλες μεθόδους προσδιορισμού του K_{ow} , όπως η μέθοδος αργής ανάδευσης κατά την οποία χρησιμοποιείται πολύ μικρή ταχύτητα ανάδευσης. Άλλο ένα παράδειγμα αποτελεί η μικροεκχύλιση πορώδους ίνας (hollow fiber membrane solvent microextraction^[31]) κατά την οποία η ταχύτητα ανάδευσης είναι μεγαλύτερη (600rpm) αλλά μικρότερη της μεθόδου που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία (2500rpm). Με τη μέθοδο hollow fiber εξετάστηκε κάτω από αυτές τις συνθήκες η ουσία aniline, η συγκέντρωση της οποίας στη φάση της οκτανόλης αυξήθηκε γρήγορα στα 15 πρώτα λεπτά και έπειτα αυξανόταν σταδιακά. Η ισορροπία επήλθε μετά το 40^ο λεπτό. Δείχθηκε επίσης ότι και οι υπόλοιπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν έφθαναν σε ισορροπία σε λιγότερο από 60 λεπτά κάτω από αυτές τις συνθήκες ανάδευσης.

Σε ακόμα μία μελέτη, όπου χρησιμοποιείται η μέθοδος ελάχιστης αφαίρεσης (negligible depletion hollow fiber membrane-protected liquid-phase microextraction^[33]) εξετάζονται οι ουσίες φαινόλη, 4-χλωροφαινόλη και 2,4-διχλωροφαινόλη για τις οποίες βρέθηκε ότι ο χρόνος που χρειάζεται για να έρθουν σε ισορροπία είναι 26, 98 και 298 λεπτά αντίστοιχα.

Επομένως, και στις δύο παραπάνω μελέτες παρατηρείται ότι ο χρόνος που χρειάζεται για να φθάσουν οι ουσίες σε ισορροπία αυξάνεται όσο πιο υδρόφοβη είναι η ουσία. Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε ο χρόνος για την πιο υδρόφοβη ουσία και διαπιστώθηκε ότι ήταν 2min. Παρατηρείται λοιπόν

μια πολύ μεγάλη διαφορά ανάμεσα στον χρόνο που χρειάζονται οι ουσίες να έρθουν σε ισορροπία ανάμεσα στις άλλες δύο μελέτες.

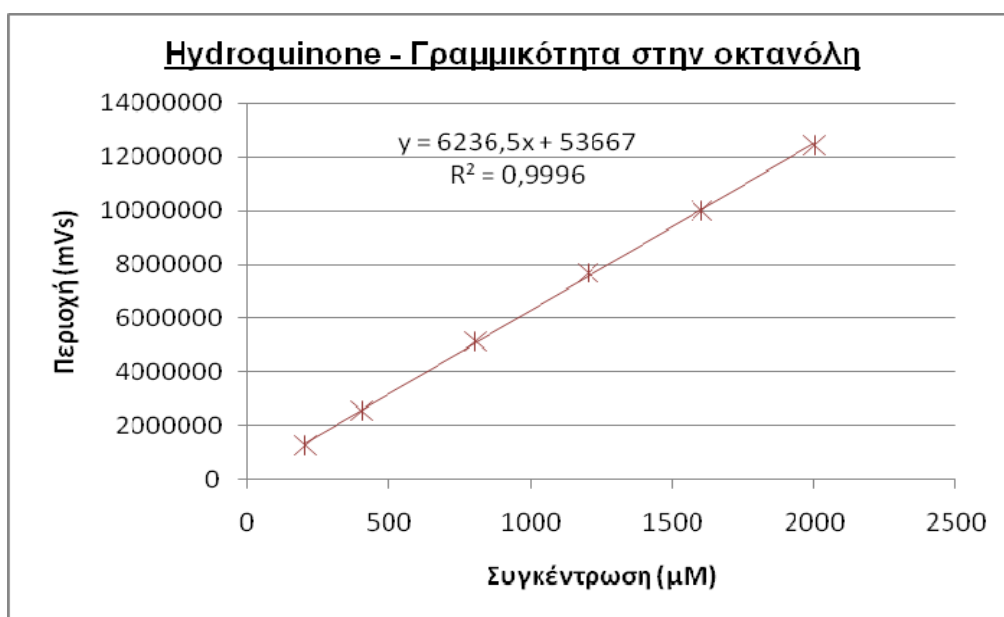
Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη αποδείχθηκε κατάλληλη για τον άμεσο προσδιορισμό του $\log K_{ow}$ διαφόρων ουσιών. Θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με ακρίβεια για ένα μεγάλο εύρος ουσιών και τα αποτελέσματα θα συμφωνούσαν με τα βιβλιογραφικά. Η χρήση της μειώνει την κατανάλωση των οργανικών διαλυτών και διευκολύνει τον προσδιορισμό του $\log K_{ow}$, που χρησιμοποιείται ευρέως στην θεραπευτική χημεία, στο σχεδιασμό φαρμάκων και στην περιβαλλοντική επιστήμη.

4. Παράρτημα I

Γραμμικότητα στην οκτανόλη

Πίνακας 12 : Αποτελέσματα γραμμικότητας για την ουσία Hydroquinone

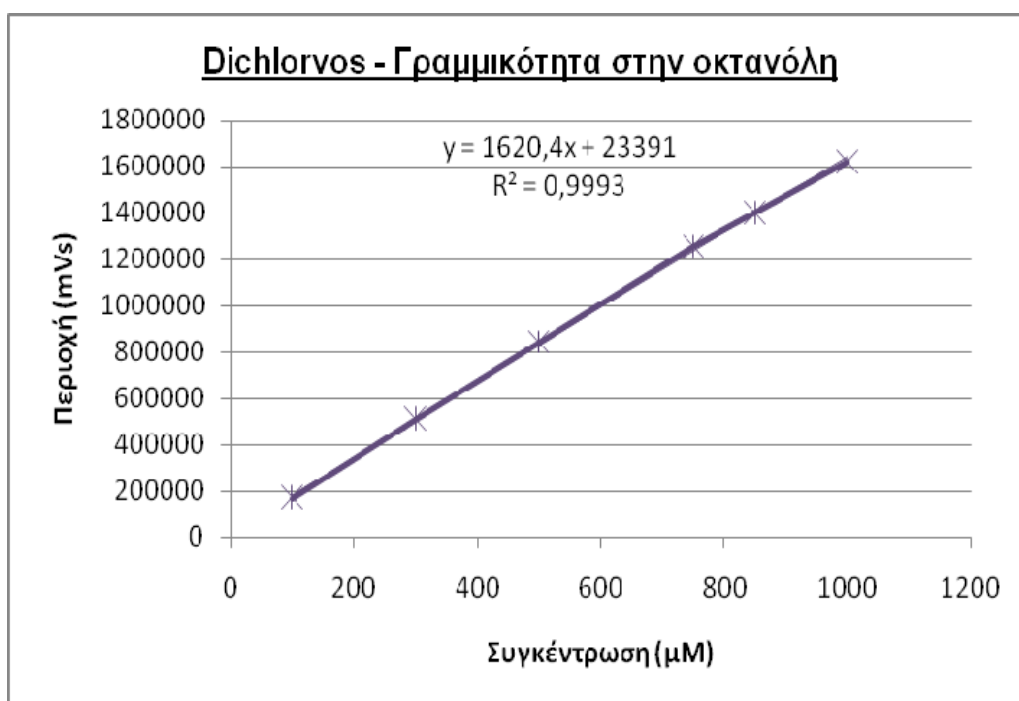
Συγκέντρωση	Περιοχή
μM	mV s
200	1218571
400	2519559
800	5132957
1200	7666978
1600	9988017
2000	12461958



Διάγραμμα 1 : Γραμμικότητα στην οκτανόλη για την ουσία Hydroquinone

Πίνακας 13 : Αποτελέσματα γραμμικότητας για την ουσία Dichlorvos

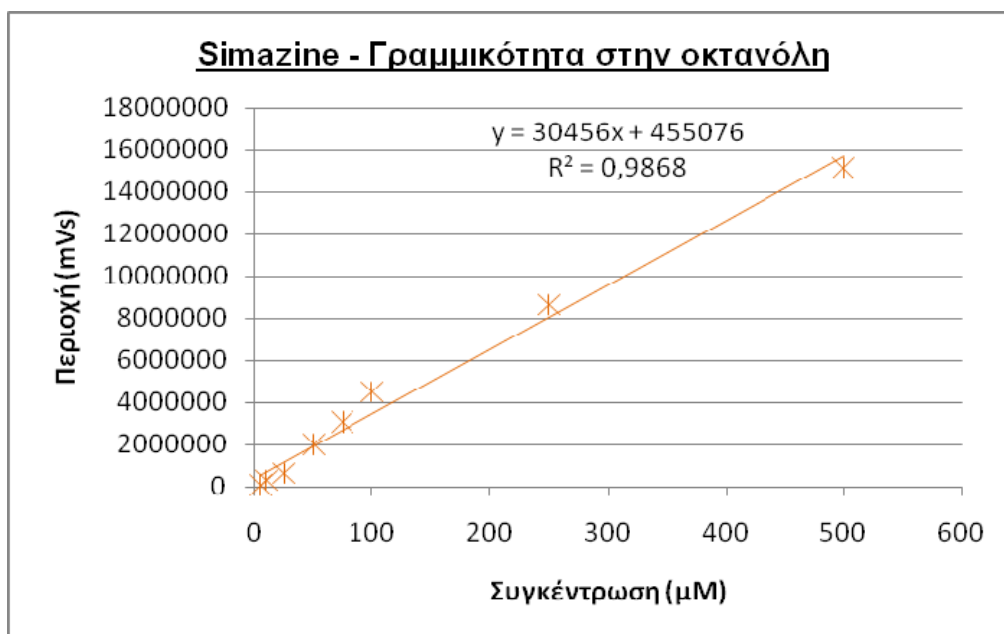
Συγκέντρωση	Περιοχή
μM	mV s
100	170995
300	512913
500	845141
750	1257048
850	1402470
1000	1623233



Διάγραμμα 2 : Γραμμικότητα στην οκτανόλη για την ουσία Dichlorvos

Πίνακας 14 : Αποτελέσματα γραμμικότητας για την ουσία Simazine

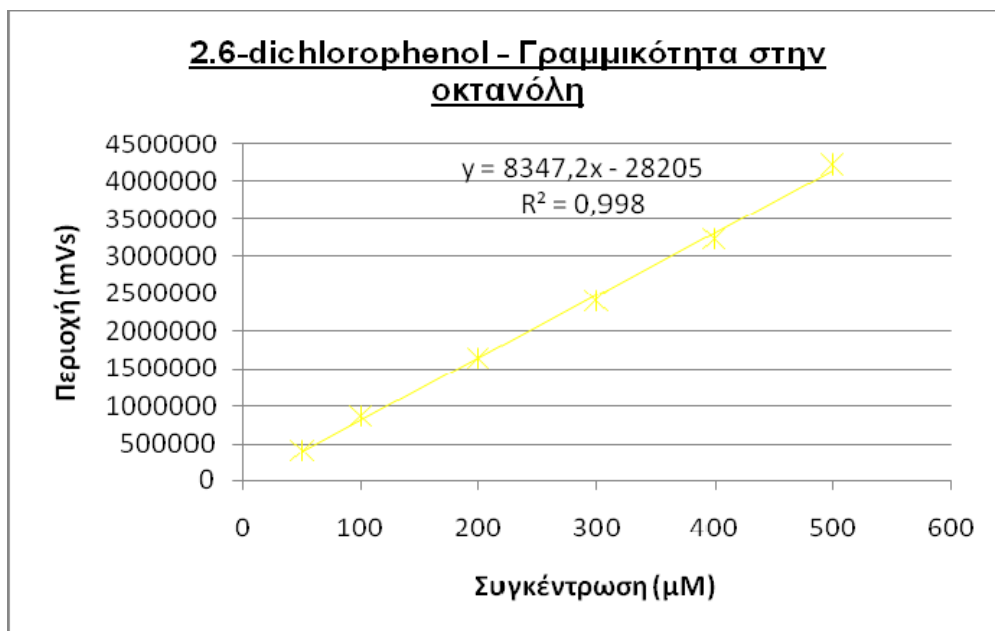
Συγκέντρωση	Περιοχή
μM	mV s
10	339747
50	2025715
75	3083845
100	4522085
250	8653872
500	15171254



Διάγραμμα 3 : Γραμμικότητα στην οκτανόλη για την ουσία Simazine

Πίνακας 15 : Αποτελέσματα γραμμικότητας για την ουσία 2.6-dichlorophenol

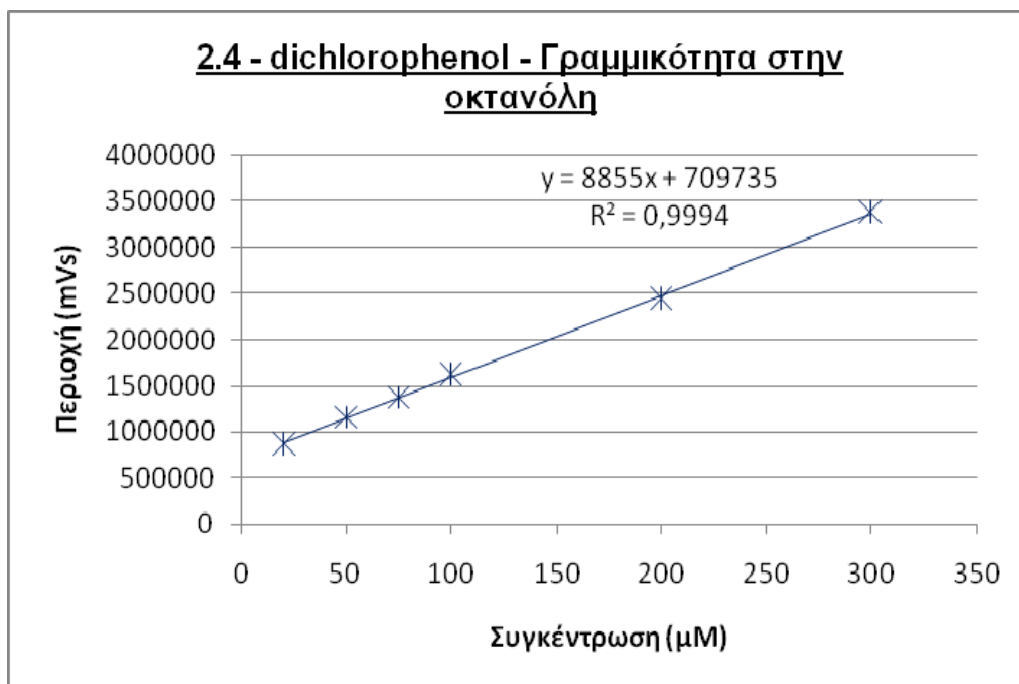
Συγκέντρωση	Περιοχή
μM	mV s
50	390808
100	857504
200	1638919
300	2412568
400	3233113
500	4236095



Διάγραμμα 4 : Γραμμικότητα στην οκτανόλη για την ουσία 2.6-dichlorophenol

Πίνακας 16: Αποτελέσματα γραμμικότητας για την ουσία 2.4-dichlorophenol

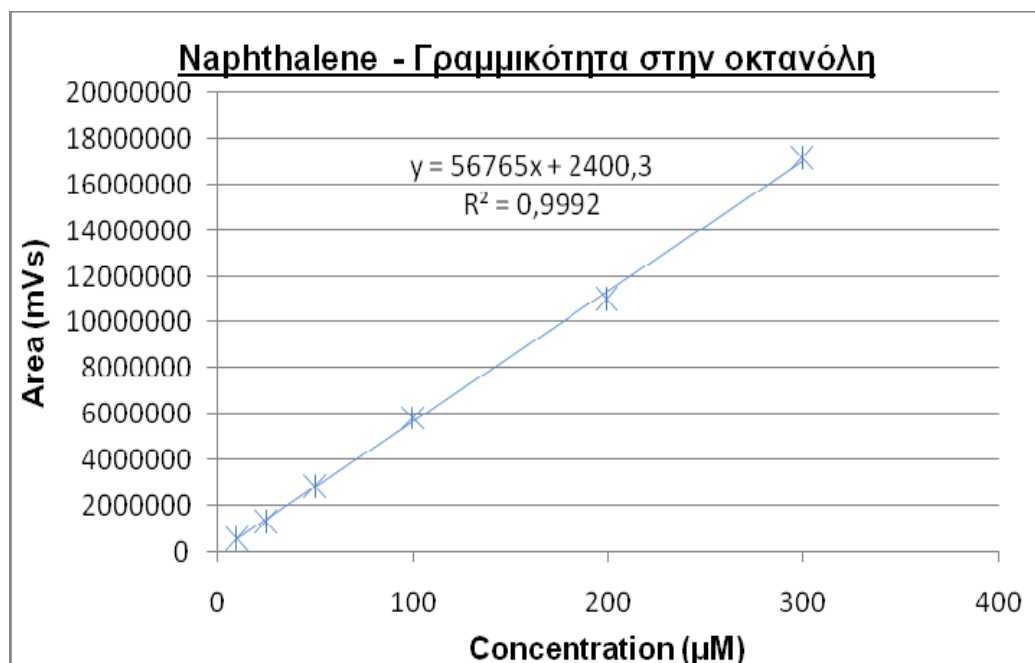
Συγκέντρωση	Περιοχή
μM	mV s
20	873653
50	1160164
75	1372451
100	1624342
200	2443408
300	3381368



Διάγραμμα 5 : Γραμμικότητα στην οκτανόλη για την ουσία 2.4-dichlorophenol

Πίνακας 17 : Αποτελέσματα γραμμικότητας για την ουσία Naphthalene

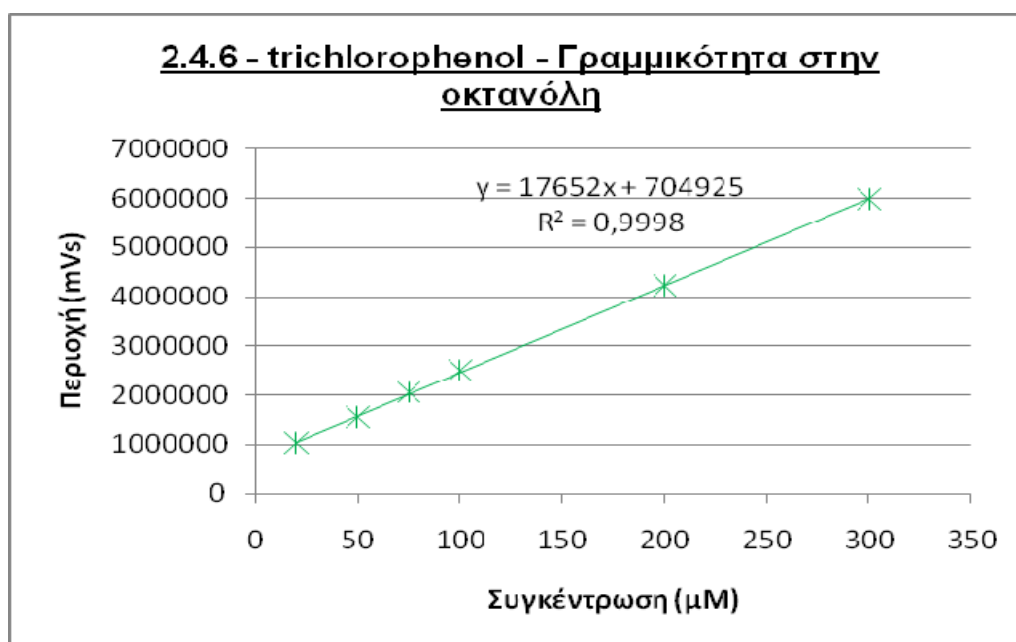
Συγκέντρωση	Περιοχή
μM	mV s
10	1513514
25	3445707
50	7258077
100	14436254
200	25592420
300	35909275



Διάγραμμα 6: Γραμμικότητα στην οκτανόλη για την ουσία Naphthalene

Πίνακας 18 : Αποτελέσματα γραμμικότητας για την ουσία 2.4.6-trichlorophenol

Συγκέντρωση	Περιοχή
μM	mV s
20	1035581
50	1565197
75	2056837
100	2499634
200	4232026
300	5991263



Διάγραμμα 7 : Γραμμικότητα στην οκτανόλη για την ουσία 2.4.6-trichlorophenol

5. Παράρτημα II

Πίνακας 19 : Συντελεστές συνεισφοράς θραυσμάτων / ατόμων για τη μέθοδο Meylan&Howard

Atom/Fragment	f_k	Atom/Fragment	f_k
<i>Carbon</i>		<i>Carbonyls</i>	
-CH ₃	0.55	al-CHO	-0.94
-CH ₂ -	0.49	ar-CHO	-0.28
-CH<	0.36	al-CO-al	-1.56
>C<	0.27	ol-CO-al	-1.27
=CH ₂	0.52	ar-CO-al	-0.87
=CH- or =C<	0.38	ar-CO-ar	-0.20
C _{ar}	0.29	al-COO- (ester)	-0.95
		ar-COO- (ester)	-0.71
		al-CON< (amide)	-0.52
<i>Halogens</i>		ar-CON< (amide)	0.16
al-F	0.00	>N-COO- (carbamate)	0.13
ar-F	0.20	>N-CO-N< (urea)	1.05
al-Cl	0.31	al-COOH	-0.69
ol-Cl	0.49	ar-COOH	-0.12
ar-Cl	0.64		
al-Br	0.40	<i>Nitrogen-Containing Groups</i>	
ar-Br	0.89	al-NH ₂	-1.41
al-I	0.81	al-NH-	-1.50
ar-I	1.17	al-N<	-1.83
		ar-NH ₂ , ar-NH-, ar-N<	-0.92
<i>Aliphatic Oxygen</i>		al-NO ₂	-0.81
al-O-al	-1.26	ar-NO ₂	-0.18
al-O-ar	-0.47	ar-N=N-ar	0.35
ar-O-ar	0.29	al-C≡N	-0.92
al-OH	-1.41	ar-C≡N	-0.45
ol-OH	-0.89		
ar-OH	-0.48	<i>Sulfur-Containing Groups</i>	
al-O-(P)	-0.02	al-SH	
ar-O-(P)	0.53	ar-SH	
<i>Heteroatoms in Aromatic Systems</i>		al-S-al	-0.40
Oxygen	-0.04	ar-S-al	0.05
Nitrogen in five-member ring	-0.53	al-SO-al	-2.55
Nitrogen in six-member ring	-0.73	ar-SO-al	-2.11
Nitrogen at fused ring location	0.00	al-SO ₂ -al	-2.43
Sulfur	0.41	ar-SO ₂ -al	-1.98
		al-SO ₂ N<	-0.44
<i>Phosphorus</i>		ar-SO ₂ N<	-0.21
≥P=O	-2.42	ar-SO ₃ H	-3.16
≥P=S	-0.66		

^a Data from Meylan and Howard (1995); total number of fragment constants derived: 130; al = aliphatic attachment, ol = olefinic attachment; ar = aromatic attachment.

Πίνακας 20 : Συντελεστές διόρθωσης για τη μέθοδο Meylan & Howard
medicinal

Table 7.5 Examples of Correction Factors, c_j , for $\log K_{ow}$ Estimation at 25°C (Eqs. 7-15 and 7-16) ^a			
Description	c_j	Description	c_j
<i>Factors Involving Aromatic Ring Substituent Positions</i> ^b			
<i>o</i> -OH/-COOH	1.19	<i>o</i> -N< /two arom. N	1.28
<i>o</i> -OH/-COO-(ester)	1.26	<i>o</i> -CH ₃ /-CON< (amide)	-0.74
<i>o</i> -N /-CON< (amide)	0.62	2 × <i>o</i> -CH ₃ /-CON< (amide)	-1.13
<i>o</i> -OR/arom. N	0.45	<i>p</i> -N /-OH	-0.35
<i>o</i> -OR/two arom. N	0.90	<i>o,m,p</i> -NO ₂ /-OH or -N<	0.58
<i>o</i> -N< /arom. N	0.64	<i>p</i> -OH/COO-(ester)	0.65
<i>Miscellaneous Factors</i>			
More than one aliph. -COOH	-0.59	Symmetric triazine ring	0.89
More than one aliph. -OH	0.41	Fused aliphatic ring	
α-Amino acid	-2.02	connection ^c	-0.34
^a Data from Meylan and Howard (1995); total number of correction factors derived: 235.			
^b <i>o</i> = <i>ortho</i> , <i>m</i> = <i>meta</i> , <i>p</i> = <i>para</i> substitution. ^c See Illustrative Example 7.2.			

Πίνακας 21 : Εξισώσεις παλινδρόμησης για τον προσδιορισμό της διαλυτότητας

Eq. No.	Equation ^a	Units of S	No. ^b	r ² ^c	Chemical Classes Represented	Ref.
2-2 ^j	$\log S = -1.37 \log K_{ow} + 7.26$	$\mu \text{ mol/L}$	41	0.903	Mixed classes; aromatics and chlorinated hydrocarbons well represented	[14]
2-3	$\log S = -0.922 \log K_{ow} + 4.184$	mg/L	90	0.740	Mixed classes; pesticides well represented	[30]
2-4	$\log S = -1.49 \log K_{ow} + 7.46$	$\mu \text{ mol/L}$	34	0.970	Mixed classes; several pesticides	[13]
2-5	$\log 1/S = 1.113 \log K_{ow} - 0.926$	mol/L^d	41	0.935	Alcohols ^e	[24]
2-6	$\log 1/S = 1.229 \log K_{ow} - 0.720$	mol/L^d	13	0.960	Ketones ^e	[24]
2-7	$\log 1/S = 1.013 \log K_{ow} - 0.520$	mol/L^d	18	0.980	Esters ^e	[24]
2-8	$\log 1/S = 1.182 \log K_{ow} - 0.935$	mol/L^d	12	0.880	Ethers ^e	[24]
2-9	$\log 1/S = 1.221 \log K_{ow} - 0.832$	mol/L^d	20	0.861	Alkyl halides ^e	[24]
2-10	$\log 1/S = 1.294 \log K_{ow} - 1.043$	mol/L^d	7	0.908	Alkynes ^e	[24]
2-11	$\log 1/S = 1.294 \log K_{ow} - 0.248$	mol/L^d	12	0.970	Alkenes ^e	[24]
2-12	$\log 1/S = 0.996 \log K_{ow} - 0.339$	mol/L^d	16	0.951	Aromatics ^e (benzene and benzene derivatives)	[24]
2-13	$\log 1/S = 1.237 \log K_{ow} + 0.248$	mol/L^d	16	0.908	Alkanes ^e	[24]
2-14	$\log 1/S = 1.214 \log K_{ow} - 0.850$	mol/L^d	140	0.912	All chemicals represented by Eqs. 2-5 to -12 plus propionitrile ^e	[24]

Eq. No.	Equation ^a	Units of S	No. ^b	r ² ^c	Chemical Classes Represented	Ref.
2-15	$\log 1/S = 1.339 \log K_{ow} - 0.978$	mol/L ^d	156	0.874	All chemicals represented by Eqs. 2-5 to -13 plus propionitrile ^a	[24]
2-16	$\log S = -2.38 \log K_{ow} + 12.90$	μ mol/L	11	0.656	Phosphate esters	[56]
2-17 ^f	$\log S = -0.9874 \log K_{ow} - 0.0095 t_m + 0.7178$	mol/L	35	0.990	Halobenzenes	[70]
2-18 ^f	$\log S = -0.88 \log K_{ow} - 0.01 t_m - 0.012$	mol/L	32	0.979	Rigid aromatic hydrocarbons (polynuclear aromatics)	[71]
2-19	$\log S = -0.962 \log K_{ow} + 6.50$	μ mol/L	9	0.878	Halogenated 1- and 2-carbon hydrocarbons (8 with Cl, 1 with Br)	[12]
2-20 ^g	$\log S = -0.00987 (t_m - 25) - 3.5055 - 0.3417 (N-6) + 0.002640 (N-6)^2$	mole fraction	21	^h	Polynuclear aromatic hydrocarbons (See note g for alkyl-substituted naphthalenes and anthracenes.)	[42]

^a S = aqueous solubility; K_{ow} = octanol/water partition coefficient; t_m = melting point (°C), t_m ≥ 25°C; N = number of carbon atoms in molecule.
^b No. = number of compounds in data set used to obtain equation.
^c r² = square of correlation coefficient.
^d Actually, moles/1000 g of water (i.e., molar solubility). For most chemicals this is very close to the molar solubility (moles/liter of solution), and no correction need be applied.
^e All chemicals used were liquids. Values of K_{ow} for many of these chemicals were estimated.
^f If t_m is less than 25°C, a value of 25°C should be used for t_m in Eqs. 2-17 and 2-18.
^g If t_m is less than 25°C, the first term on the right side of Eq. 2-20 should be set equal to zero. For alkyl-substituted naphthalenes and anthracenes, multiply the last three terms on the right side of Eq. 2-20 by a factor of 2 before solving for S. This equation is a combination of three equations given in Ref. 42.
^h Not available.
ⁱ [Note added in final proof.] The published version of this equation [7b] differs from the version given here, which was taken from the draft [14]. The revised equation, based on a 27-compound subset of the 41 compounds used for Eq. 2-2, is [7b]: $\log S = -1.12 \log K_{ow} + 7.30 - 0.015 t_m$. For this equation r² = 0.922; the melting point of the compound, t_m (°C), is set equal to 25°C if the compound is a liquid at 25°C.

Πίνακας 22 : Εξισώσεις παλινδρόμησης για τον προσδιορισμό του παράγοντα βιοσυγκέντρωσης

Eq. No.	Equation ^a	N ^b	r ^{2c}	Chemical Classes Represented	Range of Independent Variable	Species Used	Ref.
5-2 ^d	$\log \text{BCF} = 0.76 \log K_{ow} - 0.23$	84	0.823	Wide (Table 5-3)	7.9 to 8.1x10 ⁶	Fathead minnow Bluegill sunfish Rainbow trout Mosquitofish	[39]
5-3 ^e	$\log \text{BCF} = 2.791 - 0.564 \log S$	36	0.49	Wide (Table 5-4)	0.001 to 50,000 ppm	Brook trout Rainbow trout Bluegill sunfish Fathead minnow Carp	[18]
5-4	$\log \text{BCF} = 1.119 \log K_{oc} - 1.579$	13	0.757	Wide (Table 5-5)	< 1 to 1.2x10 ⁶	Various	[18]

^a. BCF = bioconcentration factor; K_{ow} = octanol-water partition coefficient; S = water solubility (ppm); K_{oc} = soil (or sediment) adsorption coefficient.
^b. N = number of chemicals used to obtain regression equation.
^c. r = correlation coefficient for regression equation.
^d. In the original equation, the octanol-water partition coefficient was represented by "p" instead of " K_{ow} ."
^e. The original equation used "WS" (water solubility) instead of "S."

6. Βιβλιογραφία

- [1] <http://www.inchem.org/>
- [2] Σημειώσεις μαθήματος περιβαλλοντικής χημείας, Πολυτεχνείου Κρήτης, τμήματος μηχανικών περιβάλλοντος
- [3] E. Psillakis, N. Kalogerakis, *Developments in liquid-phase microextraction*, Trends in Analytical Chemistry, 2003
- [4] *Octanol – water partition coefficients, Fundamental and physical chemistry*, 1997, J. Sangster
- [5] A.Finizio , M.Vighi , D.Sandroni, *Determination of n-octanol/water partition coefficient (K_{ow}) of pesticide critical review and comparison of methods*, Chemosphere, Vol. 34, No. 1, 131-161, 1997
- [6] W. Schrader, J.T.Anderson, *Fast and direct method for measuring 1-octanol – water partition coefficients exemplified for six local anesthetics*, University of Munster, Wilhelm-Klemm-Str. 8, D-48145
- [7] K.B.Woodburn, W.J.Doucette, A.W.Andren, *Generator column determination of octanol/water partition coefficients for selected polychlorinated biphenyl congeners*, Environ. Sci. Technol. 1984, 18, 457-459
- [8] W.L. Klotz , M.R. Schure , J.P. Foley, *Determination of octanol–water partition coefficients of pesticides by microemulsion electrokinetic chromatography*, J. Chromatogr. A 930 (2001) 145-154
- [9] Zhongjiang Jia , Lijie Mei, Fangling Lin, Sujuan Huang, Robert B. Killion, *Screening of octanol–water partition coefficients for pharmaceuticals by pressure-assisted microemulsion electrokinetic chromatography*, J. Chromatogr. A 930 (2003) 203-208
- [10] B.J. Herbert, J.G. Dorsey, Anal. Chem. 67 (1995) 744
- [11] S. Schreier, S.V.P. Malheiros, E. Paula, Biochim. Biophys. Acta 1508 (2000) 210
- [12] Y. Ishihama, Y. Oda, K. Uchikawa, N. Asakawa, Anal. Chem. 67 (1995) 1588
- [13] S.J. Gluck, M.H. Benko, R.K. Hallberg, K.P. Steele, J. Chromatogr. A 744 (1996) 141
- [14] S.K. Poole, D. Durham, C. Kibbey, J. Chromatogr. B 745 (2000) 117
- [15] W.L. Klotz, M.R. Schure, J.P. Foley, J. Chromatogr. A 930 (2001) 145

- [16] Y. Mrestani, R.H.H. Neubert, A. Krause, *Pharm. Res.* 15 (1998) 799
- [17] C.E. Kibbey, S.K. Poole, B. Robinson, J.D. Jackson, D. Durham, J. *Pharm. Sci.* 90 (2001) 1164
- [18] <http://petrotech.teikav.edu.gr>
- [19]
- [20]
- [21]
- [22] C. Gonzalez-Barreiro, E. Martinez-Carballo, A. Sitka, S. Scharf, O. Gans, *Anal. Bioanal. Chem.* (2006) 386: 2123-2132
- [23] E. Psillakis, N. Kalogerakis, *Developments in single-drop Microextraction Trends Anal. Chem.*, 21, 54-64, 2002
- [24] J. Pawlszyn, S. Pedersen-Bjergaard, *Analytical Microextraction: Current Status and Future Trends*, *J. Chromatogr. Sci.*, 44, 291-307, 2006
- [25] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, *Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle*, *Anal. Chem.*, 69, 235-239, 1997
- [26] H. Liu, P.K. Dasgupta, *Analytical Chemistry in a Drop. Solvent Extraction in a Microdrop*, *Anal. Chem.*, 68, 1817-1821, 1996
- [27] C. Nerín, M.R. Philo, J. Salafranca, L. Castle, 2002, *Determination of Bisphenol-Type Contaminants from Food Packaging Materials in Aqueous Foods by Solid-Phase Microextraction-High Performance Liquid Chromatography*, *J. of Chrom. A.*, 963, 375-380
- [28] L. Yangcheng, L. Quan, L. Guangsheng, D. Youyuan, *Directly Suspended Droplet Microextraction*, *Anal. Chim. Acta*, 566, 259-264, 2006
- [29] H. Fang, Z. Zeng, L. Liu, *Centrifuge Microextraction Coupled with On-Line Back-Extraction Field Amplified Sample Injection Method for the Determination of Trace Ephedrine Derivatives in the Urine and Serum*, *Anal. Chem.*, 78, 6043-6049, 2006
- [30] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *Determination of Organic Compounds in Water Using Dispersive Liquid – Liquid Microextraction*, *J. Chromatogr. A*, 1116, 1-9, 2006
- [31] Yu Gao Guo & Jie Zhang & Dan Ning Liu & Hua Feng Fu, *Determination of n-octanol–water partition coefficients by hollow-fiber membrane solvent microextraction coupled with HPLC*, *Anal Bioanal Chem*, 2006

[32] *Introduction to biochemical engineering*, 2000, D.G.Rao

[33] Jing-fu Liu^a , Xiao-qiang Cai^{a,b} , Zi-fu Li^b , Gui-bin Jiang^a , *Development of negligible depletion hollow fiber membrane-protected liquid-phase microextraction for simultaneous determination of partitioning coefficients and acid dissociation constants*, Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 2583-2586