



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Μικροεκχύλιση Με Χρήση Ηλεκτρομεμβράνης για την
Ανάλυση Παραβενίων σε Υδατικά Δείγματα και
Απόβλητα»**

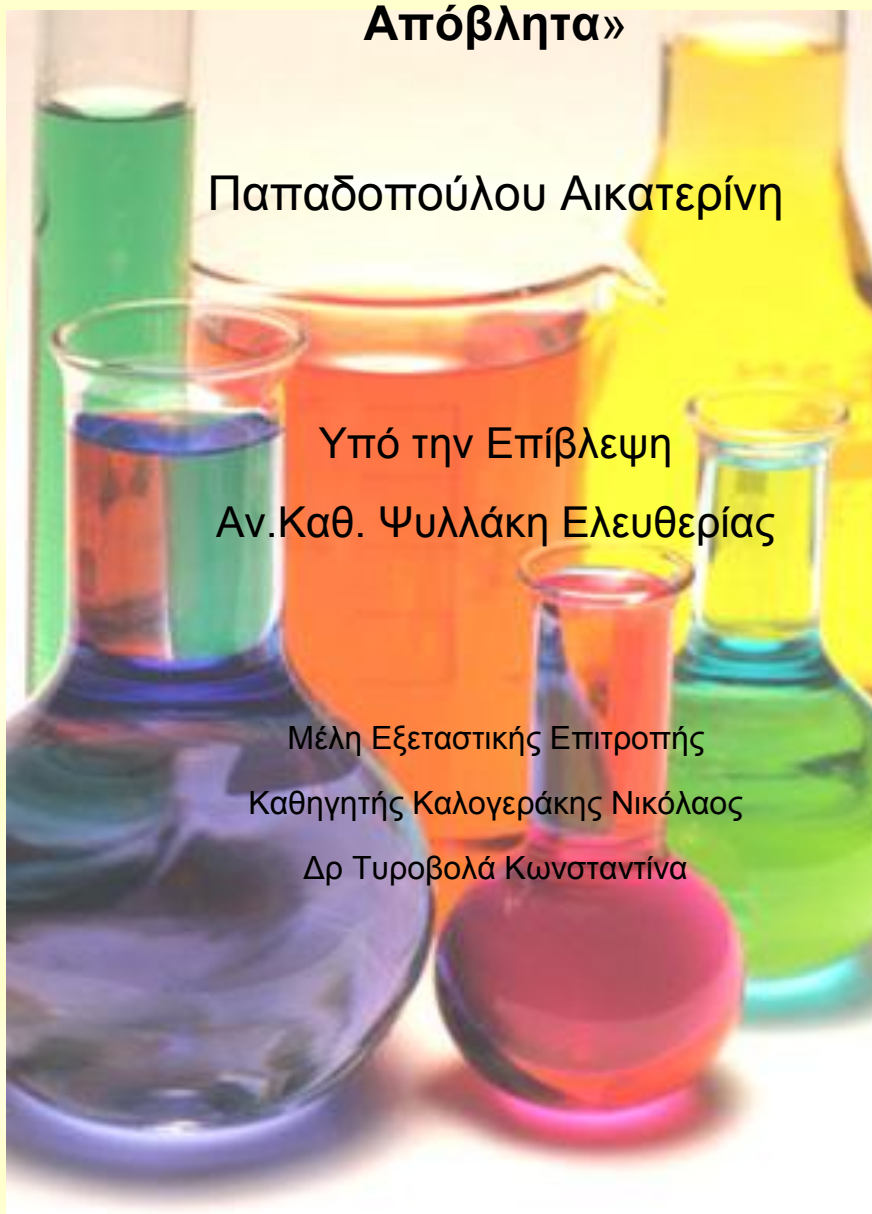
Παπαδοπούλου Αικατερίνη

Υπό την Επίβλεψη
Αν.Καθ. Ψυλλάκη Ελευθερίας

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής
Καθηγητής Καλογεράκης Νικόλαος
Δρ Τυροβολά Κωνσταντίνα

Χανιά

Ιούλιος 2010



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Ευχαριστίες	Σελ.4
1. Περίληψη – Abstract	Σελ.5
2. Εισαγωγή	Σελ.6
2.1 Παραβένια	Σελ.6
2.1.1. Γενική Δομή Παραβενίων	Σελ.6
2.2 Φυσικοχημικές Ιδιότητες Παραβενίων	Σελ.7
2.2.1 Μεθυλ - παραβένια	Σελ.7
2.2.2 Αιθυλ - παραβένια	Σελ.8
2.2.3 Προπυλ - παραβένια	Σελ.9
2.2.4 Βουτυλ - παραβένια	Σελ.10
2.3 Χρήσεις Παραβενίων	Σελ.11
3. Τοξικότητα	Σελ.12
3.1 Έλεγχος οξείας τοξικότητας σε υδατικούς οργανισμούς	Σελ.13
3.2 Επιδράσεις στην Ανθρώπινη Υγεία	Σελ.14
3.2.1 Κίνδυνος για την υγεία	Σελ.15
3.2.2 Οιστρογονική Δραστηριότητα - Καρκίνος του μαστού	Σελ.15
4. Τύχη Παραβενίων στο Περιβάλλον	Σελ. 18
4.1 Παραπροϊόντα Παραβενίων στο Χλωριωμένο νερό	Σελ.18
4.2 Φωτοδιάσπαση Βουτυλ – παραβενίου	Σελ.20
4.3 Φωτοκαταλυτική Διάσπαση Μέθυλ – παραβενίου	Σελ.21
4.4 Περιβαλλοντική Επίπτωση	Σελ.22
5. Ισχύουσα Νομοθεσία	Σελ.23
6. Σύγχρονες Μέθοδοι Προετοιμασίας Δειγμάτων και Ανάλυσης	Σελ.25

6.1 Εκχύλιση υγρής φάσης (liquid – liquid extraction, LLE)	Σελ.25
6.2 Εκχύλιση Στερεής φάσης (solid – phase extraction, SPE)	Σελ.25
6.3 Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (solid – phase microextraction, SPME)	Σελ.26
6.4 Μικροεκχύλιση υγρής φάσης (liquid – phase microextraction, LPME)	Σελ. 26
6.5 Υγρή μικροεκχύλιση σωληνοειδούς μεμβράνης (HF-LPME)	Σελ.28
6.6 Μέθοδος εκχύλισης ηλεκτρομεμβράνης (Electromembrane extraction – EME)	Σελ.30
6.7 Προτεινόμενη Μέθοδος Μικρο – εκχύλισης	Σελ.32
6.8 Θεωρητικό Υπόβαθρο Μικρό – εκχύλισης Ηλεκτρομεμβράνης	Σελ.34
7. Πειραματικό Μέρος	Σελ.37
7.1 Αντιδραστήρια	Σελ.37
7.2 Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων	Σελ.37
7.3 Όργανα – Συσκευές	Σελ.38
7.4 Περιγραφή Προτεινόμενης Πειραματικής Διαδικασίας Προετοιμασίας Δειγμάτων – ΕΜΜΕ	Σελ.40
8. Αποτελέσματα - Συζήτηση	Σελ.45
8.1 Βελτιστοποίηση LC-DAD	Σελ.45
8.2 Βελτιστοποίηση Μεθόδου : Παράμετροι που επηρεάζουν τη μέθοδο μικροεκχύλισης – ηλεκτρομεμβράνης	Σελ.47
8.2.1 Επιλογή Μεμβράνης SLM	Σελ.47
8.2.2 Επίδραση του pH	Σελ.48
8.2.2.1 Επίδραση του pH του διαλύματος – δότη (donor)	Σελ.49
8.2.2.2 Επίδραση του pH του διαλύματος - δέκτη (acceptor)	Σελ.51
8.2.3 Επιλογή Ηλεκτρικού Δυναμικού	Σελ.53

8.2.4 Επιλογή Χρόνου Ανάδευσης	Σελ.55
8.2.5 Επιλογή Ταχύτητας Ανάδευσης	Σελ.56
9. Απόδοση της Μεθόδου – (Method Performance)	Σελ.58
9.1 Γραμμικότητα	Σελ.58
9.2 Επαναληψιμότητα Μεθόδου (Repeatability)	Σελ.64
10. Εφαρμογή Βέλτιστων Συνθηκών σε Περιβαλλοντικά Δείγματα	Σελ.65
11. Συμπεράσματα	Σελ.67
12. Μελλοντικές Κατευθύνσεις	Σελ.69
Βιβλιογραφία	Σελ.70

Ευχαριστίες

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος κ. Ψυλλάκη Ελευθερία για τις πολύτιμες γνώσεις και την καθοδήγηση καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής. Επίσης την ευχαριστώ θερμά για την ευκαιρία που μου προσέφερε να διδαχτώ από διεθνώς αναγνωρισμένη ομάδα της Φαρμακευτικής Σχολής του Όσλο στη Νορβηγία, τις βασικές αρχές τις μεθόδου που χρησιμοποίησα.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Stig Pedersen Bjergaard και τη Δρ. Astrid Gjellstad για όλη την υπομονή και την καλή θέληση να μεταβιβάσουν την εμπειρία και τις γνώσεις τους και να βοηθήσουν νέους επιστήμονες.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής Καθηγητή κ. Καλογεράκη Νικόλαο και τη Δρ. Τυροβολά Κωνσταντίνα για την καθοδήγηση και το χρόνο που αφιέρωσαν για τη διατριβή αυτή και τη συμμετοχή τους στη εξέταση της.

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ - ABSTRACT

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας καινοτόμου μεθόδου προσυγκέντρωσης παραβενίων από υδατικά δείγματα που βασίζεται στη πρόσφατα δημοσιευμένη μεθοδολογία μικρο – εκχύλισης ηλεκτρομεμβράνης (Electromembrane microextraction – EMME). Οι αρχές της μεθόδου αυτής βασίζονται στην εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού έτσι ώστε οι φορτισμένοι ρύποι να εκχυλίζονται αποτελεσματικά από υδατικά διαλύματα μέσω ενός λεπτού στρώματος οργανικού διαλύτη ακινητοποιημένου στους πορώδεις τοίχους μιας σωληνοειδούς μεμβράνης (hollow fiber) και τελικά μέσα στο υδατικό διάλυμα (δέκτη) που έχει τοποθετηθεί στο εσωτερικό της μεμβράνης (σύστημα τριών φάσεων). Η διαφορά δυναμικού των 50 Volt εφαρμόστηκε για να εκχυλιστούν οι εν λόγω ρύποι μέσω της οκτανόλης, ενώ για περαιτέρω διέγερση της διεργασίας πραγματοποιήθηκε ισχυρή ανάδευση των δειγμάτων (1000 rpm). Ακολούθως το διάλυμα- δέκτης αναλύθηκε από μηχανήμα Υγρής Χρωματογραφίας με ανιχνευτή υπεριώδους ορατού - Liquid Chromatography – Diode Array Detector (LC-DAD).

Οι παράμετροι που επηρεάζουν την ηλεκτροκινητική και μελετήθηκαν έτσι ώστε να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης, περιλάμβαναν: την επιλογή του οργανικού διαλύτη, την επιλογή του όγκου καθώς και του pH του υδατικού διαλύματος – δότη και του pH του διαλύματος δέκτη, την εφαρμογή του ηλεκτρικού δυναμικού και τη διάρκειά του, την ταχύτητα και τη διάρκεια ανάδευσης του δείγματος. Η καμπύλη βαθμονόμησης έδειξε γραμμικότητα με συντελεστή συσχέτισης r^2 που κυμαινόταν από 0.937 έως 0.955. Τα όρια ανίχνευσης βασισμένα σε αναλογία σήματος – θορύβου ίση με τρία ήταν στο εύρος 5 έως 28 $\mu\text{g/L}$. Η σχετική τυπική απόκλιση της ανάλυσης για συγκέντρωση παραβενίων ίση με 50 $\mu\text{g/mL}$ βρέθηκε κυμάνθηκε σε εύρος 7.4 έως 9,9% ($n=6$) ενώ για συγκέντρωση 500 $\mu\text{g/mL}$ βρέθηκε εύρος 4 έως 18 % ($n=5$). Η μέθοδος επίσης εφαρμόστηκε στην εκχύλιση παραβενίων από πραγματικά υδατικά δείγματα (δείγματα βιολογικού καθαρισμού) προκειμένου να μελετηθεί η επιρροή του υποστρώματος στην ανάλυση δειγμάτων με πολύπλοκη μήτρα.

Συνολικά για πρώτη φορά εφαρμόστηκε η μεθοδολογία αυτή επιτυχώς για αναλογία όγκων που αντιστοιχεί στην περιοχή μικροεκχύλισης οδηγώντας στην δημιουργία ενός ευαίσθητου πρωτόκολλου που είναι σε θέση να προσδιορίζει παραβένια σε πολύπλοκα υποστρώματα.

2. Εισαγωγή

2.1 Παραβένια

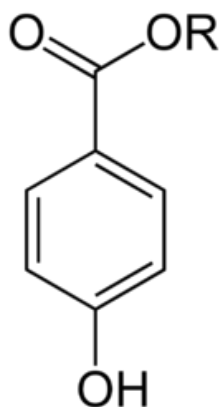
Η παγκόσμια προσοχή αυξάνεται ολοένα και επικεντρώνεται πάνω σε μια ομάδα χημικών ενώσεων γνωστές ως παραβένια ή parabens οι οποίες παράγονται τόσο φυσικά όσο και από τον άνθρωπο τα τελευταία 50 χρόνια. Οι πιο γνωστές ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι τα μέθυλ - παραβένια (methylparabens), τα έθυλ - παραβένια (ethylparabens), τα πρόπυλ - παραβένια (propylparabens) αλλά και τα βούτυλ - παραβένια (butylparabens) τα οποία διαφοροποιούνται μεταξύ τους εξαιτίας της διαλυτότητας τους και της αντιμικροβιακής τους δραστηριότητας^[28].

Χημικά, είναι εστέρες του παρα - υδροξυβενζοϊκού οξέος από όπου προκύπτει και η ονομασία τους, δηλαδή παράγονται από την εστεροποίηση του παρα - υδροξυβενζοϊκού οξέος με την κατάλληλη αλκοόλη. Παρά την εκτεταμένη χρήση τους όμως ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους παραμένει ακόμη ανακριβής και πρέπει να διευκρινιστεί^[19].

Οι εστέρες ορίζονται ως χημικές ενώσεις στις οποίες ένα μόριο οξέος συγκρατείται με χημικό δεσμό με ένα μόριο αλκοόλης αντικαθιστώντας ένα μόριο νερού^[7,8,9]. Οι εστέρες είναι πολύ συνηθισμένοι στην οργανική χημεία και τα βιολογικά υλικά και συχνά έχουν ένα χαρακτηριστικό φρουτώδες άρωμα, γεγονός που οδηγεί στην εκτεταμένη χρήση τους στη βιομηχανία αρωμάτων αλλά και τροφών.

2.1.1 Γενική Δομή Παραβενίων

Η γενική δομή των παραβενίων φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα, όπου R αντιπροσωπεύει αλκυλική ομάδα.

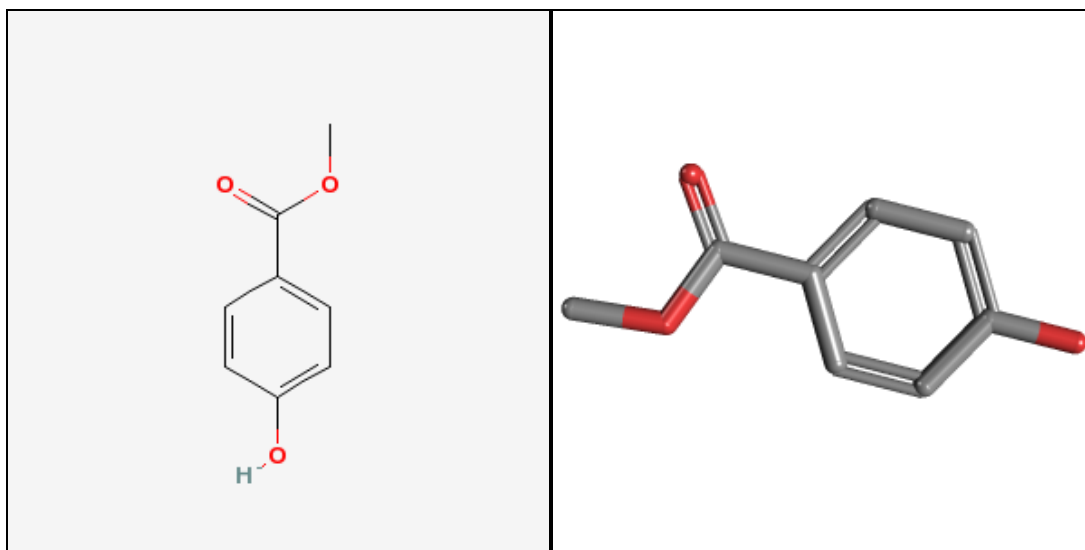


Εικόνα 1: Γενική δομή παραβενίων^[1]

2.2 Φυσικοχημικές Ιδιότητες Παραβενίων

2.2.1 Μέθυλ – παραβένια

Τα μεθυλ – παραβένια αποτελούν τους μεθυλεστέρες του π – υδροξυβενζοϊκού οξέος, έχουν τον ακόλουθο χημικό τύπο: $\text{CH}_3(\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})\text{COO})$, μοριακό τύπο $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$, μοριακό βάρος 152.15 g/mol, σημείο τήξης τους 131°C και σημείο βρασμού τους 275 °C ενώ η διαλυτότητα τους στο νερό ανέρχεται στα 2500 mg/L στους 25°C και η σταθερά Henry ισούται με 2.23E-009 atm·m³/mole. Ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης – νερού logP ισούται με 1.96, η σταθερά διάσπασης pKa ισούται με 8.4 ενώ η πίεση ατμών ίση με 0.000237mm Hg (25°C) ^[3]. Αντίθετα με τα υπόλοιπα παραβένια (ethylparaben, propylparaben, butylparaben) ο μεθυλεστέρας του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος λαμβάνει την ειδική του ονομασία εξαιτίας του γεγονότος ότι η χημική δομή του περιλαμβάνει μέθυλ – αλκυλική ομάδα^[26].

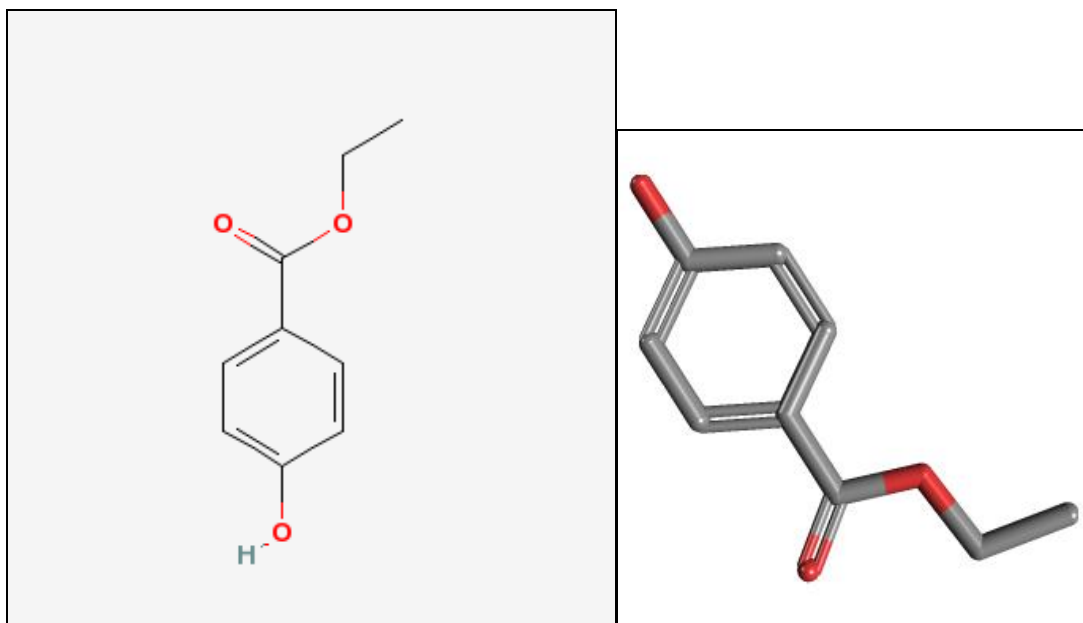


Εικόνα 2: Μοριακή Δομή Μέθυλ – παραβενίου ^[18]

Είναι άχρωμη κρυσταλλική ή λευκή σκόνη και ενδεχομένως να έχει ελαφρά χαρακτηριστική μυρωδιά και ελαφρά καυστική γεύση. Έχει ανθεκτικότητα στην υδρόλυση σε ζεστό ή κρύο νερό αλλά υδρολύεται σε αλκαλικά διαλύματα ενώ είναι σταθερό στον αέρα. Στη φύση έχει ανιχνευθεί σε αγριοβατόμουρα σε συγκέντρωση 0.15 ppm και λευκό κρασί ενώ έρευνες υποστηρίζουν πως είναι συστατικό της φερομόνης των σκύλων^[26].

2.2.2 Αιθυλ – παραβένια

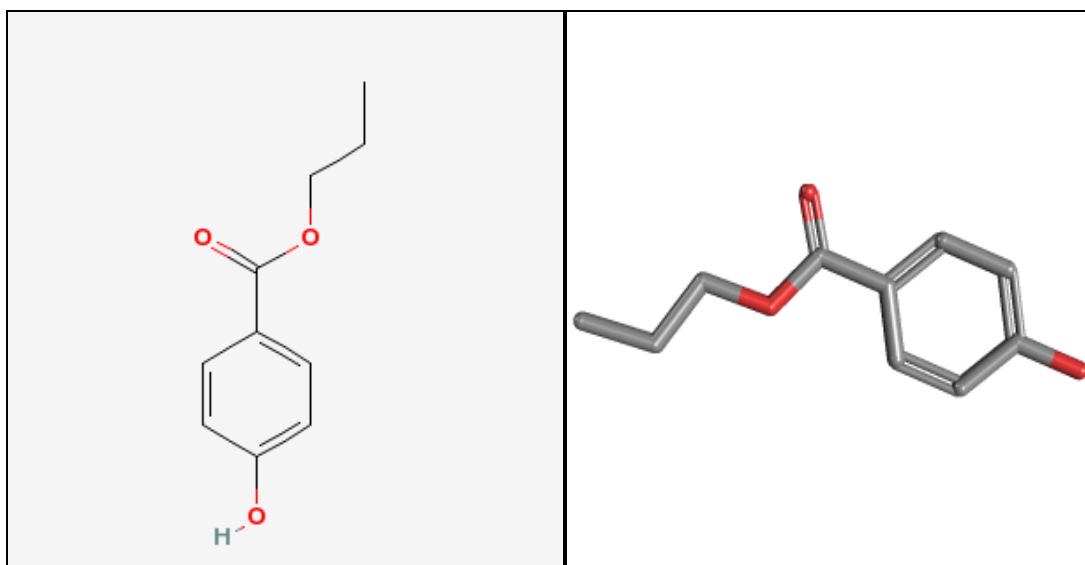
Τα αιθυλ – παραβένια αποτελούν τους αιθυλεστέρες του π – υδροξυβενζοϊκού οξέος και έχουν χημικό τύπο $\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-CO-O-CH}_2\text{CH}_3$, μοριακό τύπο $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$, μοριακό βάρος 166.18 g/mol, σημείο τήξης στους 115-118 °C και σημείο βρασμού τους 297.5 °C ενώ η διαλυτότητα τους στο νερό ανέρχεται στα 885 mg/L στους 25°C. Ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης – νερού logP ισούται με 2.47 ενώ η πίεση ατμών ίση με 9.29E - 005 mm Hg [3] (25°C). Η σταθερά διάστασης pKa ισούται με 8.34 και η σταθερά Henry με 4.79E – 009 atm · m³ / mole [3].



Εικόνα 3 : Μοριακή Δομή Αιθυλ – παραβενίου [18]

2.2.3 Προπυλ – παραβένια

Τα προπυλ – παραβένια αποτελούν τους προπυλεστέρες του π – υδροξυβενζοϊκού οξέος και έχουν μοριακό τύπο $C_{10}H_{12}O_3$, μοριακό βάρος 180.21 g/mol, σημείο τήξης στους 97°C, σημείο βρασμού στους 95 – 98°C, διαλυτότητα στο νερό 500 mg/L (25°C), συντελεστή κατανομής οκτανόλης νερού logP 3.04, πίεση ατμών ίση με 0.000555 mm Hg (25°C), σταθερά διάστασης pKa ισούται με 7.91 και η σταθερά Henry με $6.37E - 009 \text{ atm} \cdot \text{m}^3 / \text{mole}$ [3].

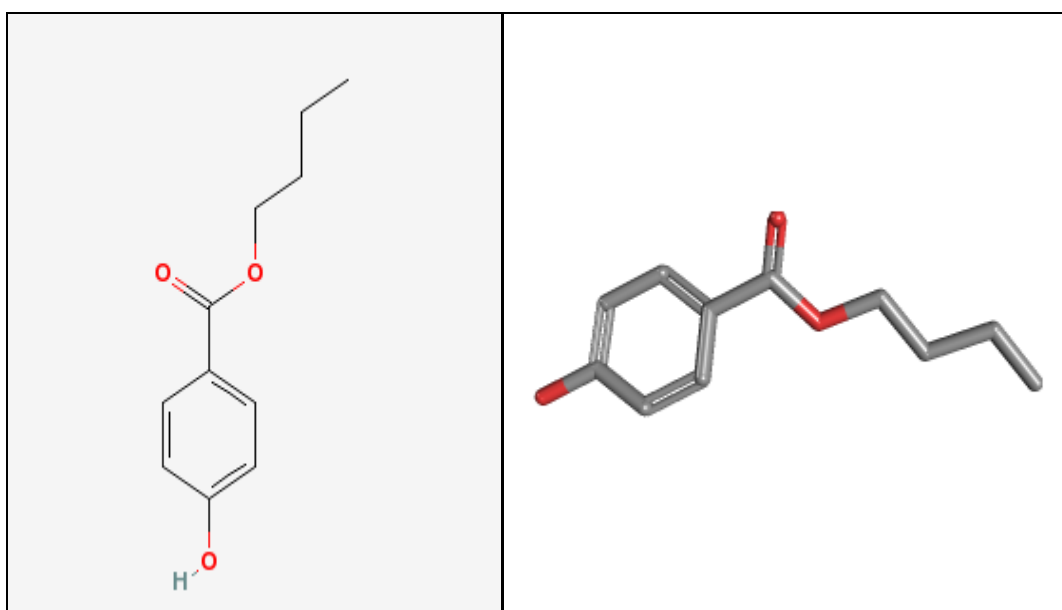


Εικόνα 4: Μοριακή Δομή Προπυλ – παραβενίου [18]

Τα προπυλ – παραβένια είναι άχρωμοι κρύσταλλοι ή λευκή σκόνη ή πεπλατυσμένο λευκό στερεό. Είναι άοσμα ή με ελαφρά αρωματική οσμή και άγευστα. Διαθέτουν τη μεγαλύτερη σταθερότητα σε pH από 4 έως 5.

2.2.4 Βουτυλ – παραβένια

Τα βουτυλ – παραβένια αποτελούν τους βουτυλεστέρες του π – υδροξυβενζοϊκού οξέος και έχουν χημικό τύπο $C_4H_9(C_6H_4(OH)COO)$, μοριακό τύπο $C_{11}H_{14}O_3$, μοριακό βάρος 194.23 g/mol και σημείο τήξης στους 68.5 °C. Η διαλυτότητά τους στο νερό είναι 207 mg/mL στους 25°C, ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης νερού logP είναι ίσος με 3.57, η πίεση ατμών 0.000186 mm Hg (25°C), η σταθερά διάστασης pKa 8.47 και η σταθερά Henry ισούται με $8.45E - 009 \text{ atm} \cdot \text{m}^3 / \text{mole}$ ^[3].



Εικόνα 5: Μοριακή Δομή Βούτυλ – παραβενίου ^[18]

Τα βουτυλ – παραβένια είναι άοσμοι λευκοί κρύσταλλοι ή κρυσταλλική σκόνη. Είναι άγευστη ένωση αλλά έχει την ιδιότητα να μουδιάζει τη γλώσσα. Σύμφωνα με έρευνες θεωρούνται επίσης ασύμβατα με ισχυρά οξειδωτικά ή ισχυρά καυστικά μέσα ^[17].

Παρόλο που η χρήση τους είναι αμφισβητήσιμη, μαζί με άλλων παραβενίων, τα βουτυλ – παραβένια εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται σε καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα. Η χρήση τους ως συντηρητικό ενάντια στους μήκυτες διατηρεί τα καλλυντικά προϊόντα σε διατηρήσιμη κατάσταση, προωθεί το υγιέστερο δέρμα και ο ρόλος τους ως ρευστό εναιώρημα σε φάρμακα είναι χρήσιμος για το μετριασμό του ρυθμού απελευθέρωσης χημικών ουσιών στο σώμα.

2.3 Χρήσεις Παραβενίων

Τα παραβένια αποτελούν μια τάξη χημικών προϊόντων ευρέως χρησιμοποιούμενα ως συντηρητικά στη βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών (pharmaceuticals and personal care products – PPCP's). Τυπικά περισσότερα από ένα παραβένια χρησιμοποιούνται σε ένα προϊόν και συνήθως βρίσκονται σε συνδυασμό και με άλλες συντηρητικές ουσίες έτσι ώστε να παρέχουν διαφύλαξη από ευρύ φάσμα μικροοργανισμών. Για παράδειγμα το 1984 τα παραβένια χρησιμοποιήθηκαν σε 13200 διαφορετικές καλλυντικές φόρμουλες. Το 1995 μια έρευνα σε 215 καλλυντικά προϊόντα ανίχνευσε παραβένια στο 99% των προϊόντων που δεν ξεπλένονται (leave-on products) και στο 77% των προϊόντων που ξεπλένονται (rinse-off products)^[24]. Η χρήση μείγματος παραβενίων επιτρέπει την ύπαρξη χαμηλότερων συγκεντρώσεων ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται η δράση συντήρησης^[16].

Όλα τα εμπορικά χρησιμοποιούμενα παραβένια παράγονται συνθετικά αν και ορισμένα είναι πανομοιότυπα με αυτά που βρίσκονται στη φύση. Χαρακτηριστικά, υπάρχουν ορισμένα φυτά που παράγουν παραβένια τα οποία χρησιμοποιούν ως μέσο προστασίας από διάφορους μηκυτώδεις και μικροβιακούς εισβολείς. Για παράδειγμα τα φυτά που είναι γνωστό ότι παράγουν μέθυλ - παραβένια είναι η πυραλίσ (wintergreen) και τα μούρα (blueberries).

Οι ρύποι αυτοί και τα άλατά τους χρησιμοποιούνται κυρίως για τις βιοκτόνες, βακτηριοκτόνες και τις μηκυτιοκτόνες ιδιότητες τους, δηλαδή για να εμποδίσουν την ανάπτυξη μικροβίων και να επιμηκύνουν τη ζωή των προϊόντων, διατηρώντας την ποιότητα και την ακεραιότητά τους. Χρησιμοποιούνται δηλαδή ως συντηρητικά ειδών προσωπικής φροντίδας και υγιεινής όπως σαμπουάν, είδη μακιγιάζ, εμπορικά ενυδατικά, ξυριστικούς αφρούς, προϊόντα περιποίησης μαλλιών (όπως αφροί ή σπρεϋ μαλλιών), προσωπικά λιπαντικά, τοπικά ή παρεντερικά φάρμακα, σε κορτικοστεροειδή, σε ψεκαστικές ή μη λοσιόν μαυρίσματος καθώς και σε οδοντόπαστες αλλά και ως πρόσθετα τροφίμων.

Γενικά στη φαρμακευτική βιομηχανία χρησιμοποιούνται ως κοινά συντηρητικά για ορισμένα φάρμακα, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη χορηγία τους στον ανθρώπινο οργανισμό με ποικίλλους τρόπους : μέσω ένεσης, δια της στοματικής οδού ή και σε μορφή υπόθετου. Στα παρεντερικά και στα οφθαλμικά παρασκευάσματα χρησιμοποιούνται ώστε να τα διατηρήσουν αποστειρωμένα κατά τη χρήση προς αποφυγή πιθανής επιμόλυνσης ύστερα από το άνοιγμα του προϊόντος.

Τα είδη τροφίμων που μπορεί να περιέχουν ομάδες παραβενίων είναι οινοπνευματώδη ποτά, κατεψυγμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, ζελατίνες, προϊόντα δημητριακών, μαρμελάδες, κονσέρβες, μεταποιημένα φρούτα και λαχανικά, ο τοματοπολτός ή η σάλτσα ντομάτας, χυμοί φρούτων, αναψυκτικά, υποκατάστατα ζάχαρης, σιρόπια και γλυκές σάλτσες. Χρησιμοποιούνται επίσης και στα εκχυλίσματα καφέ αλλά και σε καρυκεύματα και μάλιστα σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 450 έως και 2000 ppm^[26].

Για παράδειγμα, ο προπυλεστέρας του π- υδροξυβενζοϊκού οξέος έχει εδραιωθεί ως συντηρητικό κατ' επιλογήν καθώς χρησιμοποιείται ειδικά για καλλυντικά με βάση το νερό, όπως ενυδατικές κρέμες, καθαριστικά αφρόλουτρα, μαλακτικά προϊόντα για τα μαλλιά αλλά και αντιηλιακά. Χρησιμοποιείται ακόμη και σε προϊόντα για χρωματισμό των χειλιών (κραγιόν), ύλες για χρωματισμό των βλεφαρίδων (μάσκαρα) καθώς και σκιές ματιών συχνά σε ποσοστά που φτάνουν το 25%. Όταν συναντάται μόνος του υπόκειται σε συστάσεις για τις συγκεντρώσεις που μπορεί να φτάσει σε ένα προϊόν αλλά το πρόβλημα ανακύπτει όταν το προϊόν περιέχει πολλαπλά παραβένια.

Η χρήση τους αυτή οφείλεται όχι μόνο στο ευρύ φάσμα της αντιμικροβιακής τους δραστηριότητας αλλά και στη σταθερότητα τους τόσο σε ποικίλες τιμές της κλίμακας pH όσο και θερμοκρασίας καθώς και στην επαρκή διαλυτότητά τους στο νερό αλλά και στο χαμηλό τους κόστος. Ακόμη, μέχρι πρότινος υπήρχε σε παγκόσμιο επίπεδο η αποδοχή τους από το θεσπισμένο νομικό πλαίσιο ενώ ένα άλλο πλεονέκτημα είναι η χαμηλή τάση τους προς απορρόφηση σε κοινά χρησιμοποιούμενα πλαστικά ή πρωτογενή υλικά συσκευασίας.

3. Τοξικότητα

Πολλές έρευνες αποδεικνύουν ότι τα παραβένια διαταράσσουν το ενδοκρινικό μας σύστημα (ενδοκρινικοί διαταράκτες, endocrine disrupters, EDs) και σύμφωνα με το Environmental Working Group (EWG) της Αμερικής συνδέονται τον καρκίνο, την ανοσοτοξικότητα και την τοξικότητα του οργανικού συστήματος (organ system toxicity). Ειδικότερα το προπυλ-, βουτυλ παραβένιο έχει αποδειχθεί από έρευνες ότι επηρεάζουν την έκκριση τεστοστερόνης και τη λειτουργία του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος σε ποντίκια και αρουραίους^[28].

Ενδοκρινικοί Διαταράκτες (EDs)

Ως ενδοκρινικοί διαταράκτες ονομάζονται οι εξωγενείς ενώσεις οι οποίες αλλάζουν τη/τις λειτουργία/ες του ενδοκρινικού συστήματος και συνεπώς προκαλούν μη επιθυμητές επιπτώσεις σε ολόκληρους οργανισμούς ή τους απογόνους τους ή τους (υπο)πληθυσμούς.

Ανάλογα με τη δραστηριότητά τους μπορούν να χαρακτηρισθούν ως διαμορφωτές οιστρογόνων ή διαμορφωτές ανδρογόνων. Οι χημικές ουσίες μπορούν να ασκήσουν την επίδρασή τους μέσω διάφορων μηχανισμών :

- Μπορεί να μιμηθούν τη βιολογική δραστηριότητα μιας ορμόνης (π.χ. των ορμονών που καθορίζουν το φύλο, τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα) και να συνδεθούν με τον κυτταρικό δέκτη, προκαλώντας άγνωστη απόκριση εκκινώντας την φυσιολογική απόκριση του κυττάρου στην φυσική ορμόνη στον λάθος χρόνο ή σε εκτεταμένη διάρκεια (συναγωνιστική δράση).

- Μπορεί να ενωθούν με τον δέκτη αλλά χωρίς να τον ενεργοποιήσουν. Εναντίως, η παρουσία της χημικής ουσίας στον δέκτη παρεμποδίζει την φυσική ορμόνη (π.χ. αντι-οιστρογόνα ή αντι-ανδρογόνα) (ανταγωνιστική δράση).

- Μπορεί να ενωθεί με τις πρωτεΐνες μεταφορείς του αίματος, αλλοιώνοντας με αυτόν τον τρόπο τον αριθμό των φυσικών ορμονών που είναι παρούσες στην κυκλοφορία.

- Μπορεί να παρεμβληθούν στις μεταβολικές διαδικασίες του σώματος, επηρεάζοντας το ρυθμό σύνθεσης ή διάσπασης των φυσικών ορμονών.

3.1 Έλεγχος οξείας τοξικότητας σε υδατικούς οργανισμούς

Όσον αφορά την τοξικότητα του μεθυλεστέρα και τον προπυλεστέρα του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος, σύμφωνα με έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, είναι γνωστό ότι πρακτικά δεν είναι τοξικοί σε ζώα διαμέσω τόσο της στοματικής όσο και της παρεντερικής οδού. Παρόλα αυτά ελάχιστες έρευνες έχουν αξιολογήσει τις επιπτώσεις τους σε υδατικούς οργανισμούς. Για την αξιολόγηση αυτή χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης EC_{50} ή αλλιώς αποτελεσματική συγκέντρωση 50 (effective concentration 50), δηλαδή η συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί το 50% της μέγιστης αναμενόμενης βιολογικής δράσης και αποτελεί όρο που προτιμάται σε μελέτη ουσιών in vitro (π.χ σε κυτταροκαλλιέργειες).

Ένα σημαντικό είδος ασπόνδυλου του γλυκού νερού που υπάρχει στο υδάτινο δίκτυο τροφής είναι το *Daphnia Magna*, το οποίο και χρησιμοποιείται πολλά χρόνια παγκοσμίως ως αντιπροσωπευτικό είδος για οικοτοξικολογική αξιολόγηση των βιομηχανικών χημικών. Επίσης το τεστ *Vibrio fischeri* αφορά τη βιοδοκιμή τοξικότητας το οποίο βασίζεται στη μείωση της βιοφωταύγειας

και την αναστολή του θαλάσσιου βακτηρίου *Vibrio fischeri* αφού εκτεθεί σε τοξικές ουσίες^[22]. (βιοφωταύγεια :εκπομπή φωτός κατά τη διάρκεια μιας ενζυμικώς καταλυόμενης βιοχημικής αντίδρασης)

Οι συνήθειες στη χρήση μεθυλεστέρες και προπυλεστέρες είναι τοξικοί και παρουσιάζουν (48h) μέσες τιμές αποτελεσματικής συγκέντρωσης EC_{50} που κυμαίνονται από 11 έως 50 mg/l στο τεστ *Daphnia magna* οξείας τοξικότητας και (72h) τιμές EC_{50} που κυμαίνονται από 15 έως 91 mg/l σε πράσινα φύκη (*Pseudokirchneriella subcapitata*) σε τεστ παρεμπόδισης ανάπτυξης^[22]. Επιπρόσθετα έχουν δημοσιευτεί έρευνες^[24] που αποκαλύπτουν ότι τα παραβένια ασκούν οιστρογονική δραστηριότητα σε διάφορους βαθμούς και σε όλες τις περιπτώσεις ασκούν ασθενή δράση με δυναμικό της τάξης του 10^{-4} έως 10^{-7} σε σχέση με τη 17-β οιστραδιόλη.

Τα αποτελέσματα της EC_{50} για τα εξεταζόμενα παραβένια που κυμαίνονται από 2.2. έως 62 mg/l υποδεικνύουν ότι είναι τοξικά για τους υδρόβιους οργανισμούς καθώς τα επίπεδα τοξικότητας των χημικών κατατάσσονται ως εξής : πολύ τοξικά στους υδρόβιους οργανισμούς : $EC_{50} < 1$ mg/l , τοξικά στους υδρόβιους οργανισμούς : EC_{50} 1-10 mg/l, επιβλαβή στους υδρόβιους οργανισμούς EC_{50} 10-100 mg/l , μη τοξικά στους υδρόβιους οργανισμούς : $EC_{50} > 100$ mg/l (Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, 1996)^[22].

Συμπερασματικά η τοξικότητα των παραβενίων τείνει να αυξάνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των μορίων άνθρακα στις πλευρικές αλυσίδες. Επίσης τα παραβένια με γραμμική πλευρική αλυσίδα είναι υψηλότερη από ότι παραβένια με διακλαδισμένες πλευρικές αλυσίδες (i- propyl ή i-butyl ομάδες).

3.2 Επιδράσεις στην Ανθρώπινη Υγεία

Τα παραβένια είναι εύκολα, πλήρως και άμεσα απορροφήσιμα από το δέρμα, το κυκλοφορικό σύστημα και το γαστρεντερικό σωλήνα δηλαδή δε βρίσκουν καμία δυσκολία στο να εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό. Είναι ασθενείς μιμητές οιστρογόνων και είναι ικανά να δημιουργήσουν δεσμούς με κυτταρικούς αποδέκτες οιστρογόνων. Η μίμηση των οιστρογόνων λέγεται ότι οδηγεί στην αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που προκαλούν καρκίνο του στήθους. Η έκφραση των γονιδίων αυτών συνήθως ρυθμίζεται από την οιστραδιόλη, το κυρίαρχο οιστρογόνο που εμφανίζεται στον άνθρωπο.

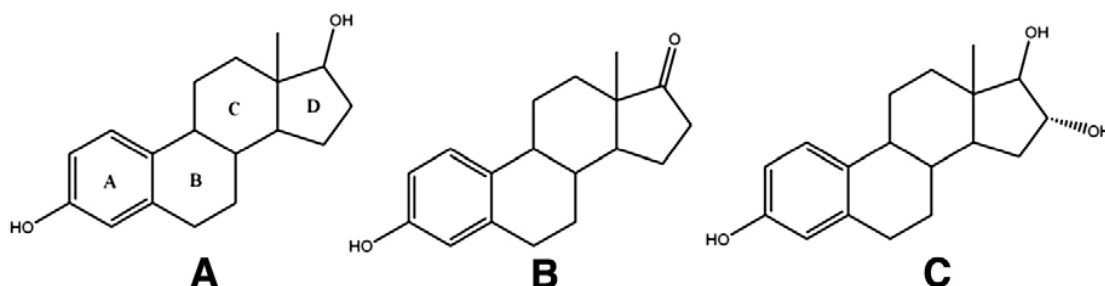
3.2.1 Κίνδυνος για την υγεία

Συμπτώματα έκθεσης σε πρότυλ – παραβένια : Τα συμπτώματα έκθεσης σε αυτή την ένωση μπορεί να περιλαμβάνουν ερεθισμό στα μάτια και το αναπνευστικό. Ενδεχομένως να προκαλέσει επίσης δερματίτιδα σε παρατεταμένη ή επαναλαμβανόμενη επαφή ενώ η εισπνοή της συμπυκνωμένης σκόνης θα μπορούσε να προκαλέσει ήπιο ερεθισμό του αναπνευστικού συστήματος. Τέλος, σε περίπτωση θέρμανσης σε βαθμό να υπάρξει αποσύνθεση της, εκπέμπεται πυκνός καπνός, ατμοί φαινολών, διοξειδίο και μονοξειδίο του άνθρακα.

Συμπτώματα έκθεσης σε βούτυλ – παραβένια : Τα συμπτώματα έκθεσης στη συγκεκριμένη ένωση περιλαμβάνουν αντιδράσεις ευαισθησίας του δέρματος, δερματίτιδα εξ επαφής, κνείδωση και αγγειοοίδημα, ενώ μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό και στα μάτια, καθώς έστω και αραιά διαλύματα αυτού του τύπου μπορεί να είναι επώδυνη και να ερεθίσει τον οφθαλμό εάν εφαρμοσθεί σε αυτόν^[17]. Σε περίπτωση θέρμανσης μέχρι να αποσυντεθεί εκπέμπεται πυκνός καπνός, ατμοί φαινολών και τοξικές αναθυμιάσεις μονοξειδίου και διοξειδίου του άνθρακα.

3.2.2 Οιστρογονική Δραστηριότητα - Καρκίνος του μαστού

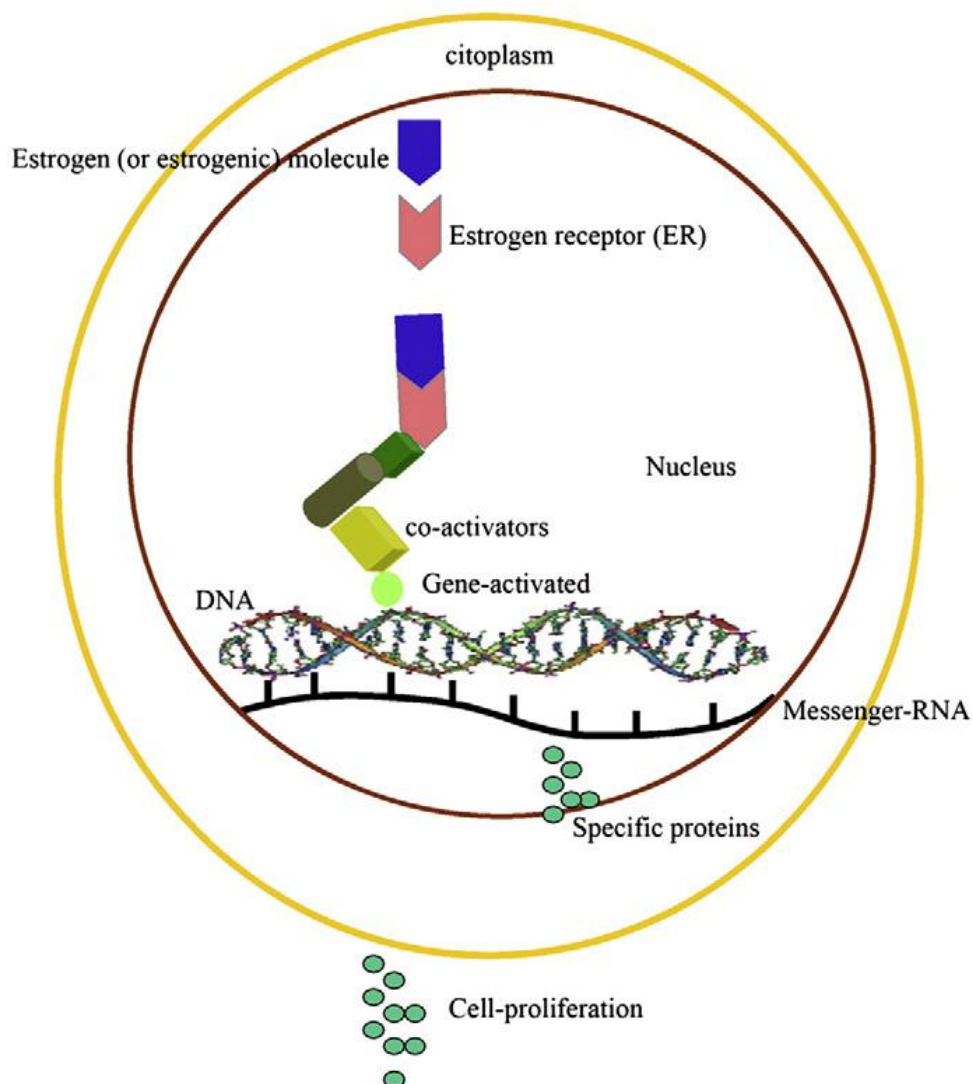
Η διάγνωση και θεραπεία κατά του καρκίνου έχουν υπάρξει ζητήματα μεγάλου ενδιαφέροντος για ομάδες διεπιστημονικής έρευνας και ένα από τα σημαντικά επακόλουθα είναι η κατανόηση των ανώμαλων μηχανισμών που ενεργοποιούνται από τη χρήση καθημερινών χημικών προϊόντων. Πρόσφατα τα παραβένια έχουν τονιστεί ως δυνητικά επιβλαβείς χημικές ουσίες, καθώς εκτός από την αντιμικροβιακή τους δραστηριότητα, επιδεικνύουν οιστρογονική δραστηριότητα δηλαδή είναι οιστρογονικοί μιμητές (βλ. Εικόνα 6) με τη δυνατότητα να αλλάξουν κατά τρόπο είτε ευεργετικό είτε επιζήμιο ιστούς – στόχους όπως του μαστού και της μήτρας ^[15].



Εικόνα 6: Οιστρογόνα : A: 17β – οιστραδιόλη (17β estradiol) , B: οιστρόνη(estrone), C: οιστριόλη (estriol) ^[15]

Για να αντιληφθεί κανείς τις επιπτώσεις μίμησης των οιστρογόνων είναι σημαντικό να αναφερθεί ο ρόλος των φυσικών ορμονών. Μετά την

αλληλεπίδραση με συγκεκριμένους υποδοχείς οιστρογόνων (estrogenic receptors, ERs) το τελικό προϊόν των οιστρογόνων είναι η κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση μέσω μιας διαδικασίας που καλείται κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Μόλις δημιουργηθεί το συγκρότημα οιστρογονικών υποδοχέων, συνδέεται με συν-ενεργοποιητές πρωτεϊνών ξεκινώντας την ενεργοποίηση γονιδίων. Δημιουργούνται μόρια του m-RNA τα οποία θα προβούν στη σύνθεση συγκεκριμένων πρωτεϊνών οι οποίες συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (βλ. Εικόνα 7). Εάν το κυψελοειδές DNA υποστεί ζημιά από μια ανώμαλη ενεργοποίηση του γονιδίου εξαιτίας μορίων οιστρογόνων (ή μιμητές οιστρογόνων), μπορεί να εμφανιστούν μεταλλάξεις και αν αυτά τα μεταλλαγμένα κύτταρα πολλαπλασιαστούν τότε το αποτέλεσμα είναι ο καρκίνος.



Εικόνα 7: Αλληλεπίδραση υποδοχέων οιστρογόνων (ERs) για να ξεκινήσει η ενεργοποίηση γονιδίων και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ^[15].

Πειραματικές αναλύσεις (με ανίχνευση HPLC) έχουν δείξει την ύπαρξη παραβενίων σε ορισμένους όγκους του μαστού σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 20.6 ± 4.2 ng ανά γραμμάριο ιστού. Σύμφωνα με συγκριτική ποσοτικοποίηση διαφορετικών παραβενίων, τα μέθυλ – παραβένια είναι αυτά που ανιχνεύθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα ενώ τα λοιπά παραβένια βρέθηκαν σε μικρότερες ποσότητες. Τα ευρήματα αυτά έγιναν η αιτία ανησυχίας δεδομένου ότι σήμερα τα παραβένια βρίσκονται ως συστατικά σε περισσότερα από 13.000 καλλυντικά προϊόντα και αποσμητικά ανά τον κόσμο. Από μελέτες των σχέσεων δομής των διαφορετικών φυσικών και συνθετικών ενώσεων όπως τα παραβένια έχει εδραιωθεί ότι συγκεκριμένα διαρθρωτικά χαρακτηριστικά συνδέονται άμεσα με την οιστρογονική δραστηριότητα.

Τα οιστρογόνα και τα παραβένια όσον αφορά τη δομή τους είναι όμοια αφού και τα δύο περιέχουν φαινολικές OH ομάδες και υδρόφοβα θραύσματα. Στην περίπτωση των παραβενίων, η σχέση της δεσμευτικής δραστηριότητας μεταξύ των ERs και της υδροφοβικότητας είναι γραμμική και για το λόγο αυτό τα παραβένια θεωρούνται πιθανοί υποκαταστάτες της 17β- οιστραδιόλης στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα ER. Με βάση τις θεωρητικές ενέργειες αλληλεπίδρασης, η σειρά της οιστρογονικής δραστηριότητας των παραβενίων είναι ως εξής : methylparaben > nButylparaben > benzylparaben > isobutylparaben με το methylparaben να είναι 1.2 φορές πιο οιστρογόνο από το τελευταίο παραβένιο^[15].

Πιο αναλυτικά, μελέτες έχουν αναφέρει αποτελέσματα που υποστηρίζουν έμμεση συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας παραβενίων και της εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Υψηλά επίπεδα παραβενίων έχουν ανιχνευθεί σε όγκους του μαστού, με μελέτη του Ηνωμένου Βασιλείου να βρίσκει υψηλά συγκεντρώσεις παραβενίων σε δεκαοκτώ από σύνολο είκοσι δειγμάτων όγκων του στήθους. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η μορφή εστέρα την οποία φέρουν τα παραβένια και βρέθηκε στους όγκους, υποδεικνύει ότι προήλθαν από προϊόν που εναποτίθεται στο δέρμα, όπως για παράδειγμα αποσμητικό, κρέμα ή σπρεϋ σώματος. Επίσης εξηγείται με τα αποτελέσματα αυτά το γεγονός ότι 60% όλων των όγκων του μαστού βρέθηκαν μόλις στο 1/5 του στήθους και συγκεκριμένα στο άνω εξωτερικό τεταρτημόριο, κοντά στη μασχάλη^[7,13]. Έχει τροφοδοτηθεί έτσι η αντίληψη ότι παραβένια που βρίσκονται στα αποσμητικά και σε άλλα καλλυντικά μπορούν να «μεταναστεύσουν» σε μαστικούς ιστούς και να συμβάλλουν στην ανάπτυξη όγκων. Άλλες έρευνες εξέτασαν δείγματα από γυναίκες που είχαν καρκινικούς όγκους του μαστού και ανιχνεύθηκε ο προπυλεστέρας του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος και στις 20 γυναίκες^[21].

Θεωρείται παρόλα αυτά αναγκαίο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω έρευνες και μελέτες για τη διερεύνηση του κινδύνου δημιουργίας καρκίνου του μαστού καθώς μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στην υγεία από την έκθεση σε παραβένια είναι ουσιαστικά άγνωστες.

4. Τύχη Παραβενίων στο περιβάλλον

Πολλά προϊόντα προσωπικής περιποίησης και υγιεινής (PPCP's) χρησιμοποιούνται καθημερινά σε ποικίλλες ανθρώπινες δραστηριότητες και κατ'επέκταση απελευθερώνονται συνεχώς στο υδάτινο περιβάλλον διαμέσω οικικών λυμάτων. Για το λόγο αυτό τόσο η ύπαρξη όσο και τα μονοπάτια μεταφοράς των ενεργών συστατικών των PPCP's στα υδάτινα συστήματα απαιτούν τελευταία ιδιαίτερη προσοχή, προκειμένου να μελετηθεί η δημιουργία παραπροϊόντων, οι ενδεχόμενες μακροπρόθεσμες επιπτώσεις και η βελτίωση της απόδοσης απομάκρυνσης τους στις εγκαταστάσεις βιολογικού καθαρισμού των υδάτων με τη χρήση προηγμένων διεργασιών οξειδωσης. Γενικά είναι παρόντα σε χαμηλές συγκεντρώσεις, γεγονός που καθιστά την απομάκρυνση τους σε συμβατικές εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων δύσκολη και δαπανηρή.

4.1 Παραπροϊόντα Παραβενίων στο Χλωριωμένο νερό

Από την άλλη, έχει δοθεί πολύ λιγότερη σημασία στη δραστικότητα των προϊόντων προσωπικής φροντίδας όταν αυτά αναμειχθούν με το νερό βρύσης που φθάνει στις οικίες^[12]. Ανεξάρτητα από την πρωτοβάθμια επεξεργασία απολύμανσης που εφαρμόζεται σε μονάδες παραγωγής, το νερό βρύσης επεξεργάζεται συνήθως με ελεύθερο χλώριο προκειμένου να εξασφαλιστεί η βακτηριολογική ποιότητα του μέσα στο δίκτυο διανομής. Το χλώριο άλλωστε είναι ισχυρό οξειδωτικό το οποίο είναι ικανό να αντιδράσει με φυσική οργανική ύλη και ανθρωπογενή χημικά αποδίδοντας αλογονωμένα παραπροϊόντα.

Τα επίπεδα του χλωρίου τα οποία περιέχονται στο νερό βρύσης είναι αρκετά υψηλά ώστε να παραχθεί σημαντικό ποσό χλωριωμένων παραπροϊόντων σε μερικά μόλις λεπτά. Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη την εκτεταμένη χρήση των παραβενίων σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας, οι καθημερινές δραστηριότητες όπως το ντους και το μπάνιο συνιστούν πηγές δερματικής έκθεσης σε χλωριωμένα παραπροϊόντα παραβενίων. Επιπρόσθετα τα δι- χλωριωμένα παράγωγα είναι πολύ ανθεκτικά για να υποβληθούν σε περαιτέρω οξειδωτικές αντιδράσεις και η παρουσία τους για πρώτη φορά ανιχνεύεται σε δείγματα νερού από λύματα. Έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί και αναφέρουν την ύπαρξη δι- χλωριωμένων παράγωγων του μέθυλ - παραβενίου και πρ'οπυλ - παραβενίου σε ακατέργαστα δείγματα λυμάτων. Οι αναλύσεις με αέριο χρωματογράφο GC-MS έχουν δείξει ότι τα χλωριωμένα παραβένια είναι σε μεγαλύτερη αφθονία από ότι οι μητρικές

ενώσεις τους^[22]. Εάν ταυτόχρονα ελάχιστες ποσότητες βρωμιούχων αλάτων είναι παρούσες σε πηγές νερού βρύσης τότε οι αντιδράσεις αλογόνωσης στρέφονται στην παραγωγή των βρωμιούχων παραβενίων. Έτσι κρίνονται απαραίτητες περαιτέρω έρευνες για την αξιολόγηση των δυνητικών κινδύνων για την υγεία και τη διερεύνηση πιθανών διαταραχών στο ενδοκρινικό σύστημα από τη δράση αλογονωμένων παραπροϊόντων των παραβενίων^[12].

Ορισμένες έρευνες επιβεβαιώνουν την παρουσία παραβενίων σε εισροές αλλά και σε εκροές βιολογικών καθαρισμών^[11], σε νερά ποταμών αλλά και σε επεξεργασμένο από λύματα νερό, όπως προαναφέρθηκε. Επίσης η παρουσία ρύπων που προέρχονται από τη χρήση PPCP's έχει παρατηρηθεί και σε νερά πισίνας, κυρίως από τη χρήση εμπορικών αντιηλιακών προϊόντων.

Γενικά η υγιεινή και η ασφάλεια όσον αφορά την ποιότητα των υδάτων κολύμβησης αποτελεί ζήτημα ιδιαίτερης ανησυχίας, καθώς είναι δυνατόν να προκληθούν διάφορες σοβαρές ασθένειες από μικροοργανισμούς που είναι παρόντες σε νερά πισίνας. Για το λόγο αυτό η απολύμανση του νερού πισίνας είναι απολύτως αναγκαία. Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως με τη χλωρίωση καθώς το στοιχείο του χλωρίου αντιδρά γρήγορα και έχει δυναμικό απολύμανσης που διαρκεί. Το χλώριο εφαρμόζεται σε νερό πισίνας ως αέριο χλώριο (gaseous chloride) ή ως υποχλωριώδες νάτριο (sodium hypochlorite) ^[11].

Παρόλα αυτά το χλώριο είναι γνωστό ότι σχηματίζει παραπροϊόντα απολύμανσης – disinfection by – products (DBPs) αντιδρώντας με τα οργανικά συστατικά. Τα παραπροϊόντα αυτά ενέχουν πολλούς κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία καθώς πολλά από αυτά είναι τοξικά και εν δυνάμει καρκινογόνα, όπως για παράδειγμα η νιτροζαμίνη που έχει εντοπιστεί σε νερά πισίνας. Ο σχηματισμός των DBPs σε χλωριωμένο νερό και συγκεκριμένα ενώσεων που περιέχουν φαινολικές ομάδες υδροξυλίου εμφανίζει θετική κινητική χλωρίωσης και για το λόγο αυτό τα παραπροϊόντα (DBPs) μπορεί να παραχθούν όταν είδη προσωπικής υγιεινής (PPCP's) που περιέχουν παραβένια έρθουν σε επαφή με χλωριωμένο νερό, όπως είναι για παράδειγμα το νερό βρύσης και τα νερά πισίνας. Όντως παραπροϊόντα μέθυλ-,πρόπυλ-παραβενίων έχουν εντοπιστεί σε επεξεργασμένα νερά από λύματα χωρίς όμως να έχει γίνει ποσοτικοποίηση μέσω χημικής ανάλυσης.

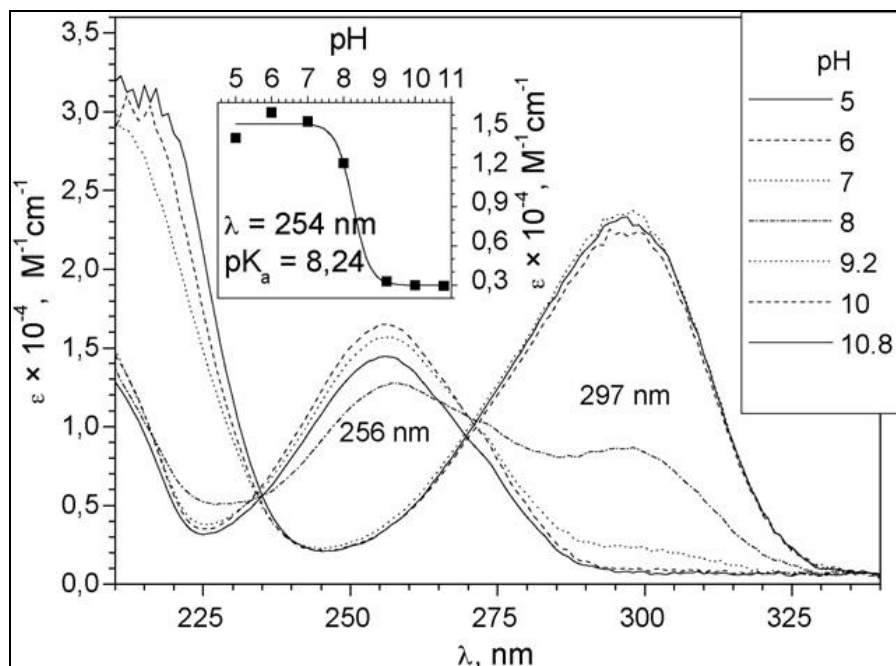
4.2 Φωτοδιάσπαση Βουτυλ – παραβενίου (Butylparaben – BP)

Πρόσφατα εκτός από τις σύγχρονες τεχνολογίες της νανοδιήθησης και της αντίστροφης όσμωσης που χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση των παραβενίων από το νερό, εξετάστηκε και μια καινούρια μέθοδος, αυτή της ακτινοβολίας με υπεριώδες φως (Ultraviolet light irradiation)^[28]. Η μέθοδος αυτή είναι μια καθιερωμένη και εμπειριστατωμένη μέθοδος για απολύμανση πόσιμου νερού αλλά είναι υπό ανάπτυξη και για εξυγίανση λυμάτων.

Κάνει χρήση μονοχρωματικού φωτός μήκους κύματος 254nm. Μαζί με την απολυμαντική δράση του, μπορεί επίσης να διασπάσει οργανικές ενώσεις με άμεση φωτόλυση ή με έμμεση διαδικασία υποβοηθούμενη από την προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου. Σε επιφανειακά ύδατα η έμμεση φωτόλυση μπορεί επίσης να προκύψει από την παραγωγή οξειδωτικών κατά τη διάρκεια της ακτινοβολίας ορισμένων συστατικών του νερού όπως είναι οι χουμικές ουσίες ή τα νιτρικά ιόντα. Αποτελεί όμως ιδιαίτερα σημαντικό παράγοντα όταν την εφαρμόζουμε, ο βαθμός διάσπασης των ενώσεων και η τοξικότητα των δημιουργούμενων υπό – προϊόντων.

Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 8) απεικονίζεται το φάσμα απορρόφησης του βουτυλ – παραβενίου. Σύμφωνα με την έρευνα του Miller et. al, 2009^[28], η φωτόλυση του BP πραγματοποιείται πολύ αργά καθώς η κατά 99% μείωση του BP επιτεύχθηκε μετά από 1.5 ώρες ακτινοβολίας, ύψους $44\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$. Η προσδιοριζόμενη απόδοση της διάσπασης του BP σε pH ίσο με 7 ανέρχεται σε $3,3 \times 10^{-3}$. Σε αλκαλικά διαλύματα η φωτόλυση του ανιόντος του BP πραγματοποιήθηκε περίπου 5 φορές πιο αργά. Επίσης, οι μετρήσεις COD και TOC αναφέρουν μικρή ανοργανοποίηση του BP σε φωτόλυση στα 254nm. Αυτό σημαίνει ότι οι δόσεις της UV ακτινοβολίας που εφαρμόζονται συνήθως για την επεξεργασία του πόσιμου νερού είναι ανεπαρκείς για την αποσύνθεση της συγκεκριμένης ένωσης. Κατά τη γνώμη των συγκεκριμένων ερευνητών η διάσπαση του βουτυλ – παραβενίου με φωτοχημικές μεθόδους για πρακτικούς λόγους απαιτεί εφαρμογή περισσότερο αποτελεσματικών μεθόδων όπως διεργασίες προηγμένης οξείδωσης, για παράδειγμα φωτοκατάλυση ή φωτόλυση παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Η έρευνα ακόμη έδειξε ότι η παρουσία χουμικών οξέων ανέστειλε το ρυθμό της αντίδρασης ενώ η παρουσία των νιτρικών ιόντων δεν επηρεάζει τη φωτόλυση. Ωστόσο η επιρροή ορισμένων φυσικών συστατικών των επιφανειακών υδάτων για τη φωτόλυση απαιτεί περαιτέρω μελέτες.



Εικόνα 8: Φάσμα Απορρόφησης του Βουτυλ – παραβενίου σε $C_0 = 8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ^[28]

4.3 Φωτοκαταλυτική Διάσπαση Μέθυλ – παραβενίου

Μεταξύ των προηγμένων διεργασιών οξειδωσης (advanced oxidation processes, AOPs) η ακτινοβολία UV και η φωτοκατάλυση με διοξείδιο του τιτανίου (TiO_2) κερδίζουν ολοένα και μεγαλύτερη αποδοχή ως αποτελεσματικές μέθοδοι επεξεργασίας λυμάτων^[29]. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε συνθήκες περιβάλλοντος καθώς το ατμοσφαιρικό οξυγόνο χρησιμεύει ως οξειδωτικό και μπορεί να οδηγήσει στην ολοκληρωτική μετατροπή του οργανικού άνθρακα σε CO_2 . Επιπρόσθετα η φωτοκατάλυση με TiO_2 είναι ευρέως διαθέσιμη, χαμηλού κόστους, μη τοξική και παρουσιάζει σχετικά υψηλή χημική σταθερότητα.

Σύμφωνα με έρευνες των Lin, Chovelon, 2009^[29], η πιο σημαντική παράμετρος για τη φωτοκατάλυση του μεθυλ - παραβενίου είναι η ροή του φωτός (light flux, D), ακολουθεί η τιμή του pH ενώ η συγκέντρωση του οξυγόνου (C) και το φορτίο του TiO_2 είναι μικρότερης σημασίας μεταξύ των τεσσάρων αυτών παραμέτρων, βασιζόμενοι σε ποσοστά 95%. Από τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών προέκυψε ότι ο γρήγορος χρόνος απομάκρυνσης προκύπτει σε υψηλές ροές φωτός ($\Phi > 3.5 \times 10^{15} \text{ photons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) και αλκαλικές τιμές του pH (7-9). Αυτοί οι δύο παράγοντες προέκυψαν ως οι δύο σημαντικότεροι για τον πειραματικό σχεδιασμό, δηλαδή είναι απαραίτητοι για την προώθηση ή την επιτάχυνση της φωτοκατάλυσης του μεθυλεστέρα, η οποία θεωρήθηκε αποτελεσματική και επιτυχής.

4.4 Περιβαλλοντική Επίπτωση

Εξαιτίας της εκτεταμένης χρήσης τους σε ποικίλλα καθημερινής χρήσης παρασκευάσματα από τον άνθρωπο, τα παραβένια είναι δυνατό να απελευθερωθούν στο περιβάλλον μέσω διάφορων ροών των αποβλήτων.

Η διάσπαση του μεθυλεστέρα που απελευθερώνεται όμως βοηθά στην απομάκρυνση τοξικών φαινολών από τον περιβάλλοντα χώρο. Το γεγονός αυτό είναι πιθανό καθώς τα βακτήρια που ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* τρέφονται από τα μόρια άνθρακα του μεθυλεστέρα και αφήνουν τις φαινόλες ως παραπροϊόν. Άλλο στέλεχος του βακτηρίου γνωστό ως ψευδομονάδα (*Pseudomonas*) καταναλώνει τη φαινόλη που έχει απομείνει, για απορρόφηση ενέργειας από τη διάσπαση της ένωσης σε αβλαβείς ενώσεις του άνθρακα.

Ατμοσφαιρική Τύχη

Εάν απελευθερωθεί στο περιβάλλον για παράδειγμα ο μεθυλεστέρας του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος, στον οποίο επικεντρώνεται η έρευνα λόγω της ευρείας χρήσης του, εξαιτίας της πίεσης ατμών ίσης με $2.4 \cdot 10^{-4} \text{ mm Hg}$, υποδεικνύεται ότι θα υπάρξει μόνο ως ατμός στην ατμόσφαιρα. Η αέρια φάση του θα διασπαστεί στην ατμόσφαιρα από την αντίδραση με φωτοχημικά παράγωγα ριζών υδροξυλίου, ενώ ο χρόνος ημιζωής για την αντίδραση αυτή στον αέρα εκτιμάται να είναι 15 ημέρες. Ο μεθυλεστέρας περιέχει χρωμοφόρα (ομάδα που απορροφά φως και έτσι προσδίδει χρώμα σε μία ένωση, χωρίς αυτό να την καθιστά και κατάλληλη ως χρωστική ουσία) τα οποία απορροφούν σε μήκος κύματος $>290 \text{ nm}$ και για το λόγο αυτό μπορεί να είναι ευπαθής σε απευθείας φωτόλυση υπό το φως του ηλίου.

Τύχη στο Έδαφος

Ο μεθυλεστέρας εάν απελευθερωθεί και κυκλοφορήσει στο έδαφος αναμένεται να έχει περιορισμένη ή μέτρια κινητικότητα εξαιτίας της υπολογισμένης τιμής K_{oc} ίση με 280. Η τιμή της σταθεράς διάσπασης, όπως έχει αναφερθεί ισούται με 8.4, υποδηλώνοντας ότι η ένωση αυτή θα υπάρχει μερικώς σε ανιονική μορφή στο περιβάλλον και γενικά τα ανιόντα δεν προσροφώνται εντονα στα εδάφη που περιέχουν άνθρακα και άργιλο ^[14]. Η πτητικοποίηση από υγρές εδαφικές επιφάνειες δεν είναι αναμενόμενη πιθανή διαδικασία εξαιτίας της υπολογισμένης σταθεράς Henry που είναι ίση με $2.2 \cdot 10^{-9} \text{ atm-cu m/mole}$. (Νόμος Henry :Η συγκέντρωση ενός αερίου σε διάλυμα του είναι ανάλογη της μερικής πίεσης του αερίου υπεράνω του διαλύματος,

^[20]). Δεν είναι πιθανό επίσης να πτητικοποιηθεί από ξηρές εδαφικές επιφάνειες εξαιτίας της τάσης ατμών του.

Τύχη στο νερό

Η 100% βιοδιάσπαση είναι μια σημαντική πιθανή περιβαλλοντική πορεία που αναμένεται στις 6 ημέρες (ακολουθούμενη από χρονικό διάστημα 2 ημερών για εγκλιματισμό) ενώ βασιζόμενοι στην τιμή K_{oc} εάν απελευθερωθεί στο νερό δεν αναμένεται να προσροφηθεί σε αιωρούμενα στερεά και ιζήματα. Ταυτόχρονα η υδρόλυση δεν είναι ούτε αυτή πιθανή αφού η ένωση αυτή δεν περιέχει λειτουργικές ομάδες που υδρολύονται υπό περιβαλλοντικές συνθήκες.

5. Ισχύουσα Νομοθεσία

P-υδροξυβενζοϊκές ενώσεις (E 214 – 219)

Οι p-υδροξυβενζοϊκές ενώσεις επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά σε ορισμένες επικαλύψεις κρεάτων, σε σνακ με βάση τις πατάτες ή τα δημητριακά, σε ξηρούς καρπούς με επικάλυψη, σε ορισμένα είδη ζαχαροπλαστικής και σε διαιτητικά συμπληρώματα διατροφής σε υγρή μορφή σύμφωνα με την οδηγία 95/2/EK.

Η επιστημονική επιτροπή τροφίμων αξιολόγησε τις p-υδροξυβενζοϊκές ενώσεις (paraben) το 1994 και όρισε ως προσωρινή αποδεκτή ημερήσια δόση (ΑΗΔ) τα 0-10 mg/kg βάρους σώματος για το άθροισμα των μεθυλεστέρων, αιθυλεστέρων και προπυλεστέρων του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος και των αλάτων νατρίου των ουσιών αυτών. Η ΑΗΔ χαρακτηρίστηκε προσωρινή, επειδή η επιστημονική επιτροπή τροφίμων έκρινε ότι οι διαθέσιμες τοξικολογικές πληροφορίες είχαν ορισμένες ανεπάρκειες και ασάφειες. Γι' αυτό, η επιστημονική επιτροπή τροφίμων ζήτησε τη διεξαγωγή νέας μελέτης τερατογένεσης στον αρουραίο δια της στοματικής οδού.

Το 2000 η επιστημονική επιτροπή τροφίμων επανέλαβε την επιθυμία της να επανεξετάσει την ασφάλεια των παραβενίων. Κατά την τελευταία της συνεδρίαση τον Απρίλιο του 2003 η εν λόγω επιστημονική επιτροπή επισήμανε ότι δεν είχαν υποβληθεί δεδομένα από τη βιομηχανία τροφίμων προς υποστήριξη των paraben και επέστησε την προσοχή στη δήλωση που είχε κάνει τον Οκτώβριο του 2000 ότι η προσωρινή ΑΗΔ θα έπρεπε να αποσυρθεί εφόσον δεν υποβάλλονταν περαιτέρω στοιχεία.

Επιπλέον, η οδηγία 2003/114 ζήτησε από την Επιτροπή να επανεξετάσει τους όρους χρήσης των E 214 – 219 p-υδροβενζοϊκών ενώσεων και των αλάτων νατρίου τους πριν από την 1η Ιουλίου 2004.

Η επαναξιολόγηση ολοκληρώθηκε τον Ιούλιο του 2004 και η ομάδα εξέδωσε γνωμοδότηση με τα ακόλουθα συμπεράσματα:

«Η Ομάδα καθόρισε μια γενική (για το σύνολο της ομάδας) αποδεκτή ημερήσια δόση (ΑΗΔ) 0-10 mg/kg βάρους σώματος για το άθροισμα των μεθυλεστέρων και αιθυλεστέρων του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος και των αλάτων νατρίου των ουσιών αυτών [...] Η Ομάδα έκρινε ότι το 4-υδροξυβενζοϊκό προπύλιο δεν πρέπει να περιληφθεί σ' αυτή την ομάδα ΑΗΔ, διότι το 4-υδροξυβενζοϊκό προπύλιο, σε αντίθεση με το 4-υδροξυβενζοϊκό μεθύλιο και το 4-υδροξυβενζοϊκό αιθύλιο, έχει επίδραση στις σεξουαλικές ορμόνες και στα αναπαραγωγικά όργανα νεαρών αρσενικών αρουραίων.

Η Ομάδα δεν είναι σε θέση να συστήσει ΑΗΔ για το 4-υδροξυβενζοϊκό προπύλιο, λόγω απουσίας σαφούς NOAEL (επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις).»

Συνεπώς, η Επιτροπή πρότεινε τον Οκτώβριο του 2004 να διαγραφούν από την οδηγία 95/2/ΕΚ το E 216 p-υδροξυβενζοϊκό προπύλιο και το E 217 p-υδροξυβενζοϊκού προπυλίου, άλας με νάτριο. Η τροποποίηση της οδηγίας 95/2/ΕΚ εγκρίθηκε από το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και το Συμβούλιο στις 5 Ιουλίου 2006.

Η οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης περί καλλυντικών περιορίζει τη μέγιστη συγκέντρωση κάθε παραβενίου ξεχωριστά σε 0.4% και την ολική μέγιστη συγκέντρωση τους σε 0.8% .

Στις Ηνωμένες Πολιτείες ο μέσος όρος συνολικής έκθεσης σε παραβένια κατά άτομο υπολογίζεται ότι είναι προσεγγιστικά 76mg/ημέρα (σε καλλυντικά και προϊόντα προσωπικής υγιεινής 50mg/ημέρα, φάρμακα 25mg/ημέρα και φαγητό 1mg/ημέρα)^[28].

6. Σύγχρονες Μέθοδοι Προετοιμασίας Δειγμάτων και Ανάλυσης

Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη ταχείων αναλυτικών μεθόδων οι οποίες να είναι ακριβείς, πιστές και ευαίσθητες αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό ζήτημα. Παρόλη την τεχνολογική πρόοδο που έχουν γνωρίσει τα εργαστηριακά όργανα, δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν τις μήτρες κατευθείαν αλλά απαιτείται ένα περαιτέρω στάδιο προετοιμασίας του εκάστοτε δείγματος έτσι ώστε αυτό να μπορεί να εισαχθεί στο όργανο και να αναλυθεί ασφαλώς.

Στον τομέα της εκχύλισης το στάδιο αυτό περιλαμβάνει την απομόνωση των ενώσεων προς ανάλυση, δηλαδή την αύξηση της συγκέντρωσης των ουσιών – στόχων ή αλλιώς τον εμπλουτισμό του δείγματος (enrichment).

6.1 Εκχύλιση υγρής φάσης (liquid – liquid extraction, LLE)

Η εκχύλιση υγρής φάσης (liquid – liquid extraction, LLE) είναι μια κλασσική τεχνική εκχύλισης η οποία συνεχίζει να χρησιμοποιείται ευρέως και αποτελεί την εκχύλιση ενός διαλύματος ουσιών με ένα υγρό διαλύτη. Βασίζεται στην κατανομή της διαλυμένης ουσίας μεταξύ δύο υγρών που πρακτικά δεν αναμιγνύονται μεταξύ τους. Έτσι η ουσία κατανέμεται μεταξύ των δύο υγρών φάσεων κατά ορισμένη αναλογία και αποκαθίσταται ισορροπία, όταν η ελεύθερη ενέργεια της διαλυμένης ουσίας είναι ίδια και στις δύο φάσεις. Είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε συνδυασμός δύο διαλυτών, συνήθως όμως η μία από τις δύο φάσεις είναι ένα υδατικό διάλυμα, ενώ η άλλη ένας οργανικός διαλύτης.

Υπάρχουν όμως μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής όπως το ότι είναι επίπονη και χρονοβόρα ως διαδικασία, με πολλά στάδια λειτουργίας ^[1]. Ευνοεί επίσης τη δημιουργία γαλακτωμάτων, γεγονός που δυσκολεύει την αυτοματοποίηση της ενώ ταυτόχρονα γίνεται χρήση μεγάλου όγκου διαλυτών υψηλής καθαρότητας που όχι μόνο αυξάνουν το κόστος αλλά εξαιτίας της τοξικότητας τους θέτουν σε κίνδυνο την υγεία του προσωπικού και δημιουργούν τοξικά εργαστηριακά απόβλητα, γεγονός που προσθέτει επιπλέον κόστος στη διαχείριση των αποβλήτων αυτών ^[3].

6.2 Εκχύλιση στερεής φάσης (solid – phase extraction, SPE)

Η εκχύλιση στερεής φάσης (solid – phase extraction, SPE) είναι μια άλλη δημοφιλής τεχνική. Παρόλο που υπάρχει δυναμικό αυτοματοποίησης της μεθόδου και χρησιμοποιεί μικρότερες ποσότητες διαλυτών είναι ακριβή. Έτσι κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών έχει γίνει μεγάλη προσπάθεια η οποία στοχεύει στην ανάπτυξη μικροσκοπικών τεχνικών προετοιμασίας

δειγμάτων ώστε να διευθετηθούν τα προαναφερθέντα μειονεκτήματα συμβατικών μεθόδων όπως η LLE και η SPE.

6.3 Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (solid – phase microextraction, SPME)

Η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (solid – phase microextraction, SPME) ανακαλύφθηκε από τον Pawliszyn το 1990 και αποτελεί μια καλά εδραιωμένη τεχνική προετοιμασίας δειγμάτων που έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την ανάλυση διαφορετικών τύπων περιβαλλοντικών ρύπων και προσμίξεων. Ξεπερνά αποτελεσματικά τις δυσκολίες συμβατικών μεθόδων εκχύλισης ελαχιστοποιώντας τη χρήση οργανικών διαλυτών επιτρέποντας στην εκχύλιση του δείγματος και στη προσυγκέντρωση να πραγματοποιούνται σε ένα μόνο βήμα. Κατά κύριο λόγο η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί εμπορικά διαθέσιμες ίνες SPME (fiber) πάνω στην επιφάνεια των οποίων βρίσκεται το προσροφητικό υλικό, και κάθε μία είναι συγχωνευνευμένη με μία στατική φάση. Έτσι με την επίτευξη της ισορροπίας ή με την πάροδο κατάλληλα καθορισμένου χρονικού διαστήματος οι προσροφημένες ενώσεις εκροφούνται θερμικά με την έκθεση της ίνας μόλις γίνει η ένεση στον αέριο (GC) ή υγρό χρωματογράφο υψηλής απόδοσης (HPLC) ώστε να αναλυθούν.

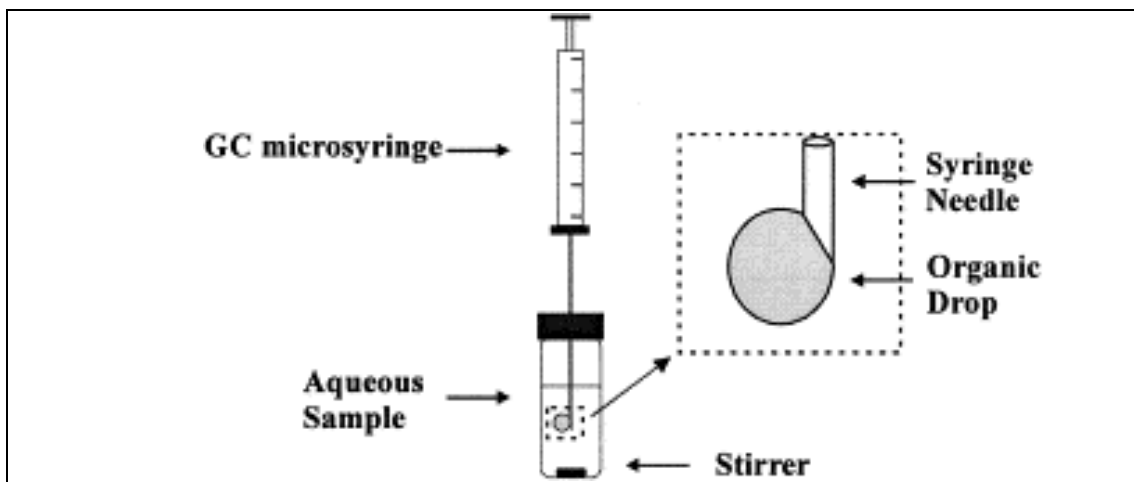
Βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου μικροεκχύλισης στερεής φάσης είναι ότι οι ίνες που χρησιμοποιούνται έχουν πολύ μεγάλο κόστος και περιορισμένο χρόνο ζωής αφού με τη χρήση αλλοιώνονται. Η μερική απώλεια της στατικής φάσης έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κορυφών που συνεκλούνται μαζί με τις προσδιοριζόμενες ουσίες επηρεάζοντας έτσι την ακρίβεια της αναλυτικής μεθόδου [2]. Επιπρόσθετα, όταν η μέθοδος μικροεκχύλισης στερεής φάσης (SPME) συνενώνεται με μηχάνημα αέριας χρωματογραφίας (GC), παρατηρείται ότι τα δείγματα συχνά συμπαρυσύρονται κατά τη διάρκεια των εγχύσεων για ορισμένες προσδιοριζόμενες ενώσεις γεγονός που είναι δύσκολο να απαλειφθεί ακόμη και σε αυξημένες θερμοκρασίες εκρόφησης ^[3].

6.4 Μικροεκχύλιση υγρής φάσης (liquid – phase microextraction, LPME)

Η μικροεκχύλιση υγρής φάσης (liquid – phase microextraction, LPME) αποτελεί με τη σειρά της μια μικρογράφιση της παραδοσιακής υγρής εκχύλισης (LLE) και θεωρείται πολύ σημαντική εξέλιξη στον τομέα της αναλυτικής χημείας. Η μεταφορά μάζας της αναλυόμενης ουσίας από την υδατική στην οργανική φάση συνεχίζεται έως ότου επέλθει θερμοδυναμική ισορροπία ή διακοπεί η μικρό-εκχύλιση και ελαττώνεται κατά πολύ η αναλογία της οργανικής με την υδατική φάση.

Μία κατηγορία αυτής της μεθόδου LPME βασίζεται στη μικρό-εκχύλιση μονής σταγόνας όπου η φάση εκχύλισης είναι μία σταγόνα ενός μη αναμίξιμου με το νερό διαλύτη αιωρούμενη σε υδατικό διάλυμα για την εκχύλιση των ζητούμενων ενώσεων από υδατικά δείγματα και τελικά ονομάστηκε μικροεκχύλιση μονής σταγόνας (single drop microextraction - SDME).

Παρακάτω παρατίθεται σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της μικρό-εκχύλισης:



Εικόνα 9: Απεικόνιση της διαδικασίας μικρό-εκχύλισης

Οι γενικές απαιτήσεις για την προετοιμασία των δειγμάτων της μεθόδου είναι η χρήση ενός οργανικού διαλύτη (φάση εκχυλιστικού αντιδραστηρίου, δηλαδή του συστατικού στο οποίο οφείλεται η εκχύλιση – extractant phase) ο οποίος δεν είναι αναμίξιμος με το νερό (υδατικό διάλυμα) και αναλυτών που είναι περισσότεροι διαλυτοί στη φάση του εκχυλιστικού αντιδραστηρίου παρά στο υδατικό διάλυμα. Προκύπτει έτσι μια μέθοδος που δεν είναι εξαντλητική αφού μικρό μόνο μέρος των αναλυτών εκχυλίζεται και προορίζεται για ανάλυση. Η μέθοδος αυτή βασίζεται επίσης στα συστήματα δύο και τριών φάσεων (two phase, three phase systems) σύμφωνα με τα οποία οι ουσίες προς ανάλυση εκχυλίζονται αντίστοιχα, σε μία σταγόνα οργανικού διαλύτη μη αναμίξιμου με το νερό ή διαμέσω ενός λεπτού στρώματος οργανικού διαλύτη το οποίο βρίσκεται στην κορυφή του διαλύματος, μέσα σε μία υδατική σταγόνα. Τελικά η σταγόνα συλλέγεται με τη μικροσύριγγα και εισάγεται σε χρωματογράφο.

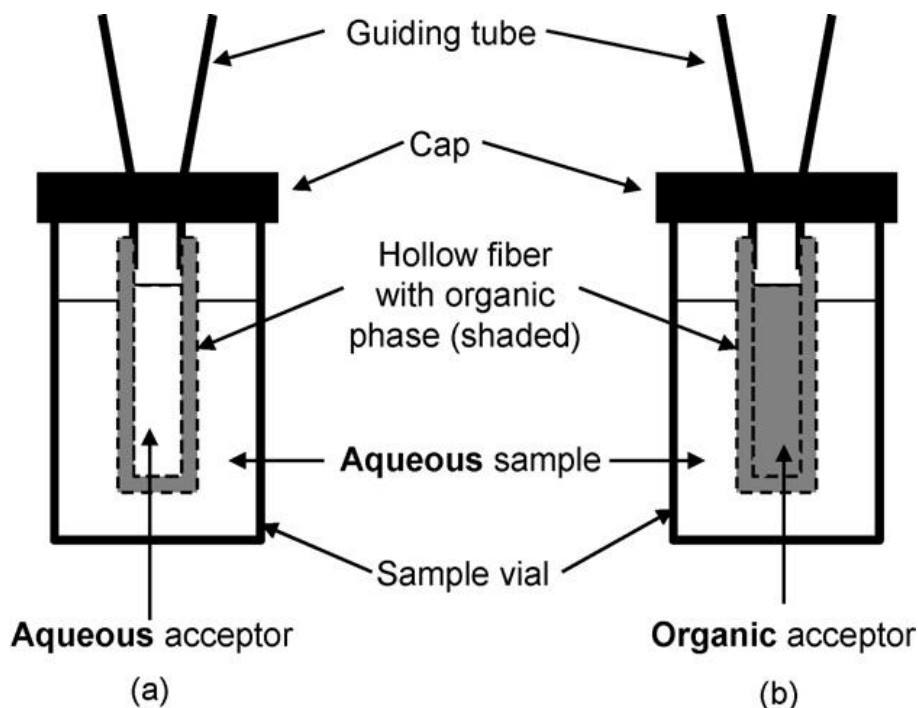
Παρόλα τα πλεονεκτήματα της προαναφερθείσας μεθόδου όμως έχει παρατηρηθεί ότι δεν είναι πολύ ισχυρή μέθοδος εξαιτίας των προβλημάτων που σχετίζονται με την αστάθεια της μικροσταγόνας. Τα προβλήματα αυτά

επικεντρώνονται σε πολύ υψηλούς ρυθμούς ανάδευσης αλλά κυρίως σε διάφορες πολύπλοκες περιβαλλοντικές μήτρες οι οποίες έχουν επιβλαβείς επιδράσεις στη σταθερότητα της σταγόνας του διαλύτη ^[1].

6.5 Υγρή μικροεκχύλιση σωληνοειδούς μεμβράνης (HF – LPME)

Ένας τρόπος για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της αστάθειας είναι να κρατηθεί το εκχύλισμα με το διαλύτη στους πορώδεις τοίχους μιας σωληνοειδούς ινώδους μεμβράνης (hollow fiber - HF) η οποία λειτουργεί ως προστατευτικό περίβλημα ^[1]. Η μέθοδος αυτή έγινε γνωστή ως υγρή μικροεκχύλιση σωληνοειδούς μεμβράνης (hollow fiber LPME) ή αλλιώς hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) η οποία προτάθηκε από Νορβηγούς επιστήμονες το 1999 και αποκτά ενδιαφέρον.

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην παθητική διάχυση (passive diffusion) και χρησιμοποιεί τους υδρόφοβους πόρους μιας κοίλας ίνας από πολυπροπυλένιο ως μεμβράνη. Η ίνα εμβαπτίζεται μέσα σε μια οργανική φάση, δημιουργώντας την «υποστηριζόμενη υγρή μεμβράνη» (supported liquid membrane - SLM) ενώ μέσα στην ίνα βρίσκεται μια τελική φάση αποδοχής (μπορεί να είναι ίδια ή και διαφορετική από αυτή που χρησιμοποιήθηκε ως οργανική φάση). Έχοντας υδατική φάση ως διάλυμα – δέκτη (φάση αποδοχής), οι ρύποι εκχυλίζονται στην ενδιάμεση οργανική φάση και ακολούθως στην υδατική φάση (Σχήμα 9a), διαδικασία που ονομάζεται υγρή μικροεκχύλιση σωληνοειδούς μεμβράνης *τριών φάσεων* (three phase HF-LPME). Άλλη εκδοχή της μεθόδου HF-LPME βασίζεται σε σύστημα δύο φάσεων στο οποίο ο οργανικός διαλύτης χρησιμοποιείται για να γεμίσει τόσο τους πόρους όσο και τη σωληνοειδή μεμβράνη ^[23] (Σχήμα 9b).



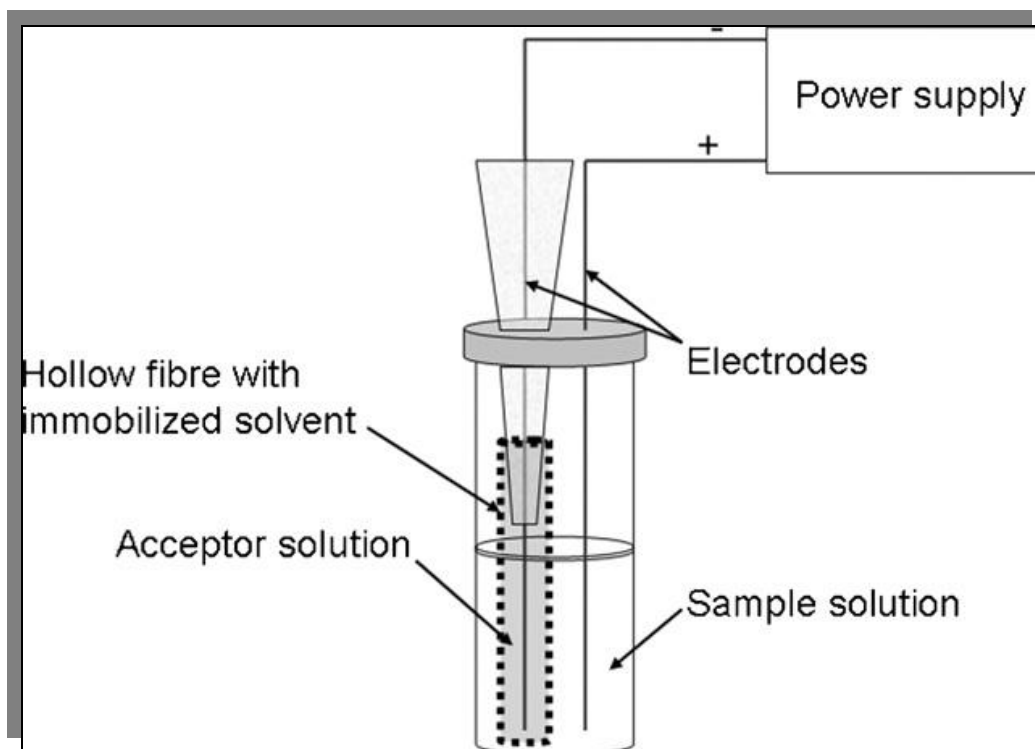
Εικόνα 10 : Σύστημα (a)τριών φάσεων και (b) δύο φάσεων HF-LPME

Αυτή η νέα μεθοδολογία μικροεκχύλισης είναι μια ελκυστική εναλλακτική λύση της μικροεκχύλισης μονής σταγόνας καθώς εκτός του ότι είναι απλή και γρήγορη, επιτρέπει και το σχηματισμό καθαρού εκχυλίσματος. Το χαμηλό κόστος της ίνας επιτρέπει επίσης τη διάθεση της έπειτα από κάθε εκχύλιση, αποκλείοντας έτσι διασταυρούμενη επιμόλυνση και αποφεύγοντας αναγέννηση ρύπων. Η HF-LPME έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στον προσδιορισμό φαρμάκων, αρωματικών αμίνων, φυτοφαρμάκων και φθαλικών ενώσεων στο νερό αλλά και σε περίπλοκες μήτρες όπως τα ούρα και το πλάσμα ^[4].

6.6 Μέθοδος εκχύλισης ηλεκτρομεμβράνης (Electromembrane extraction - EME)

Συνέχεια της HF-LPME αποτελεί η μέθοδος εκχύλισης ηλεκτρομεμβράνης (Electromembrane extraction - EME) η οποία προτάθηκε αρχικά από τους Petersen – Bjergaard και Rasmussen ^[1,5,6,25,27,30,31,32,33] και βασίζεται στην ηλεκτροκινητική μεταφορά. Περιλαμβάνει εκτός από όλα τα χαρακτηριστικά λειτουργίας της μεθόδου HF-LPME και την εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού σε όλο το στρώμα του οργανικού διαλύτη, μέσα στους πορώδεις τοίχους της σωληνοειδούς μεμβράνης, ώστε να μεταφερθούν οι φορτισμένοι ρύποι μέσα στο διάλυμα – δέκτη το οποίο βρίσκεται μέσα στη μεμβράνη. Έτσι οι ρύποι διασχίζουν την υγρή μεμβράνη, εκχυλίζονται επιλεκτικά, παγιδεύονται εκεί εξαιτίας του ιονισμού και εμπλουτίζουν το διάλυμα – δέκτη.

Έχει αποδειχθεί ότι η μέθοδος αυτή δρα ως μια γρήγορη και επιλεκτική τεχνική για την απομόνωση φορτισμένων ουσιών από πολύπλοκες μήτρες, ενώ ταυτόχρονα ελαχιστοποιεί τη χρήση οργανικών διαλυτών. Μέχρι σήμερα οι περισσότερες από τις δημοσιευμένες εφαρμογές της EME εστιάζουν στον προσδιορισμό φαρμάκων σε βιολογικά δείγματα.



Εικόνα 11: Σχηματική Αναπαράσταση της διάταξης για τη μέθοδο EME

Πιο αναλυτικά για την εκχύλιση βασικών ουσιών το pH στο διάλυμα – δότη (όγκου 300μL) και στο διάλυμα – δέκτη (όγκου 30μL) ρυθμίστηκε να είναι σε όξινες περιχές (τιμή 2) με προσθήκη υδροχλωρίου (HCl) για να διασφαλιστεί ο πλήρης ιονισμός των ενώσεων στόχων. Το θετικό ηλεκτρόδιο τοποθετήθηκε στο διάλυμα - δότη και το αρνητικό ηλεκτρόδιο στο δέκτη. Η εκχύλιση πραγματοποιείται με την εφαρμογή 300V στην «υποστηριζόμενη υγρή μεμβράνη» (ή supported liquid membrane) SLM και η διαδικασία ολοκληρώνεται ύστερα από 5 λεπτά. Η σύνθεση της μεμβράνης βρέθηκε να παίζει σημαντικό ρόλο για την επιτυχή έκβαση της μεθόδου και έτσι η χρήση του διαλύτη 2- nitrophenyl octyl ether (NPOE) λειτούργησε αποτελεσματικά παρέχοντας ανακτήσεις σε ποσοστά από 70-79%.

Συμπληρωματικά με τις βασικές ουσίες, αναλύθηκαν και όξινα φάρμακα τα οποία και εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο της EME. Στην περίπτωση αυτή τόσο το διάλυμα – δότης όσο και το διάλυμα - δέκτης ρυθμίζονται όσον αφορά το pH σε βασικές περιοχές, έτσι ώστε να ιονιστούν οι ενώσεις-στόχοι, γεγονός που είναι απαραίτητο για να επιτευχθεί η ηλεκτροκινητική μεταφορά ενώ ταυτόχρονα η πολικότητα των ηλεκτροδίων αντιστρέφεται σε σχέση με τις βασικές ενώσεις. Αυτό σημαίνει ότι το αρνητικό ηλεκτρόδιο τοποθετείται στο διάλυμα – δότη και το θετικό ηλεκτρόδιο στο διάλυμα – δέκτη. Με την επτανόλη ως οργανική φάση εκχυλίστηκαν 11 όξινα φάρμακα με εφαρμογή 50V^[33].

Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου EME είναι η σημαντική μείωση των χρόνων εκχύλισης συγκριτικά με την LPME. Σε πρόσφατες έρευνες^[23] αποδεικνύεται ότι η μέθοδος της EME είναι 6-17 φορές ταχύτερη από ότι η LPME, ανάλογα με τη μορφή του συστήματος εκχύλισης. Ιδιαίτερα στις περιπτώσεις μικρών όγκων του διαλύματος – δότη, η απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων στο φυαλίδιο είναι μικρή και η EME φαίνεται να είναι πολύ αποτελεσματική και έτσι απεικονίζεται το ισχυρό δυναμικό των ηλεκτρικών πεδίων ως κινητήρια δύναμη για εκχυλίσεις σε μικρογραφημένα συστήματα.

Παρόλα τα πλεονεκτήματα που αναφέρθηκαν όμως, υπάρχουν και μειονεκτήματα της μεθόδου που πρέπει να αναφερθούν. Για παράδειγμα, η μέθοδος της EME δεν υπόκειται στην κλίμακα της μικροεκχύλισης καθώς ο όγκος του διαλύματος – δότη δεν είναι πάνω από 1 ml και ο όγκος του δέκτη είναι περίπου ίσος με 30 μL, δηλαδή έχει μικρούς λόγους όγκου δότη / όγκο δέκτη $V_{donor}/V_{acceptor}$. Παρατηρήθηκαν επίσης υψηλές σχετικές τυπικές αποκλίσεις μεταξύ των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων. Για το γεγονός αυτό ευθύνονται αρκετοί παράγοντες όπως το ότι είναι κριτικής σημασίας η παραμονή των ενώσεων στη μεμβράνη ύστερα από τη μεταφορά τους από το διάλυμα – δότη και η μη-εκχύλιση τους στο διάλυμα – δέκτη επηρεάζοντας τις τιμές ανάκτησης των ενώσεων, λειτουργεί δηλαδή η οργανική φάση ως

εμπόδιο στη μεταφορά τους.^[33] Είναι επομένως σημαντικό να βρεθεί συνδυασμός διαλυτών για τη σύσταση της υγρής υποστηριζόμενης μεβράνης προκειμένου να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση με μεγαλύτερα ποσοστά ανάκτησης, παράγοντας που αυξάνει το βαθμό δυσκολίας της μεθόδου. Επίσης πρέπει να επισημανθεί το ότι η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε με εξοπλισμό που κατασκευάστηκε εντελώς ερασιτεχνικά χωρίς αυτοματισμούς, στοιχείο που επηρέασε την απόδοση, την επαναληψιμότητα αλλά και τη γραμμικότητα της μεθόδου.

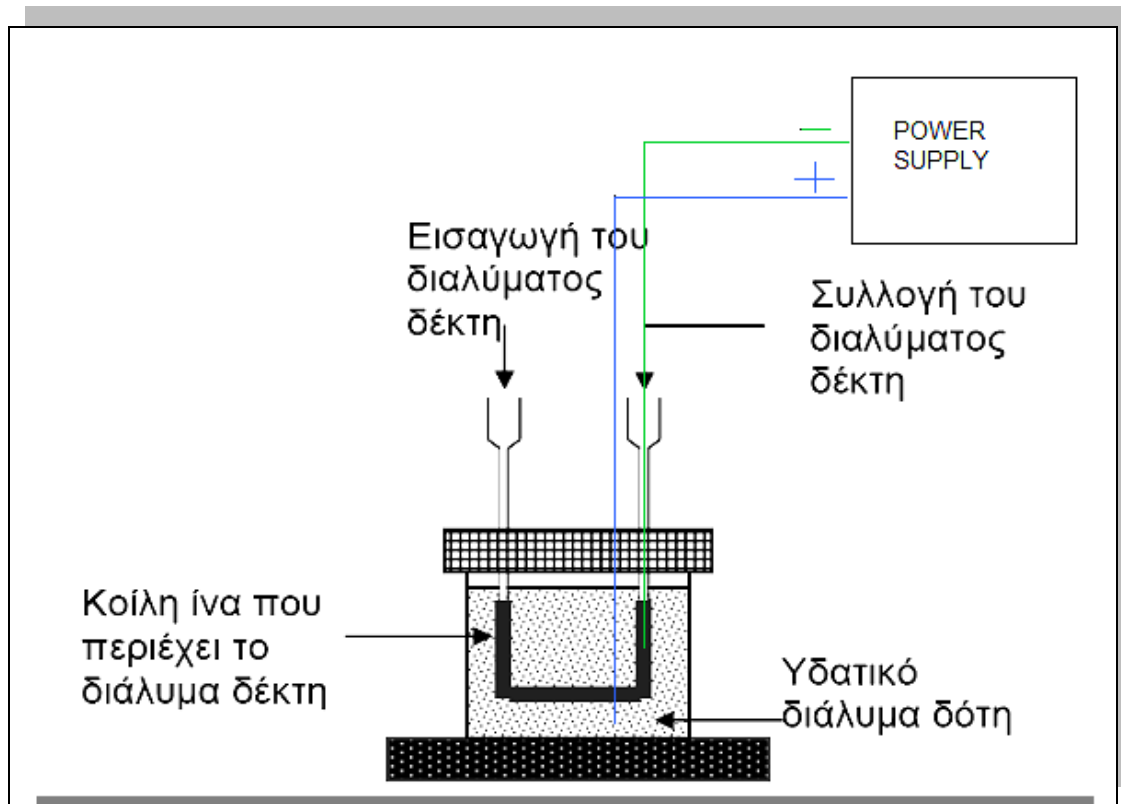
6.7 Προτεινόμενη Μέθοδος Μικρο – εκχύλισης

Η προτεινόμενη μέθοδος αποτελεί μια εξέλιξη της μεθόδου ΕΜΕ καθώς η κινητήρια δύναμη μεταφοράς των ρύπων από το διάλυμα – δότη στο διάλυμα – δέκτη μέσω της μεμβράνης είναι η διαφορά δυναμικού. Η παρούσα εργασία ερευνά την εφαρμοσιμότητα της εντελώς καινούριας μεθόδου μικρο – εκχύλισης ηλεκτρομεμβράνης (Electromembrane Microextraction – ΕΜΜΕ) όσον αφορά την ανάλυση παραβενίων σε δύσκολες περιβαλλοντικές μήτρες. Για πρώτη φορά εισάγεται η έννοια της μικρο – εκχύλισης στον τομέα της ηλεκτρομεμβράνης καθώς μεγαλώνει κατά πολύ ο λόγος $V_{\text{DONOR}} / V_{\text{ACCEPTOR}}$ αφού το διάλυμα – δότης έχει όγκο 7mL ενώ το διάλυμα – δέκτης αντίστοιχα όγκο 25mL.

Για να εξασφαλιστεί ο πλήρης ιονισμός των ενώσεων – στόχων το pH τόσο του διαλύματος - δότη όσο και του διαλύματος – δέκτη ρυθμίζεται με προσθήκη υδροχλωρίου HCl. Το θετικό ηλεκτρόδιο τοποθετείται στο διάλυμα – δότη ενώ το αρνητικό στο διάλυμα – δέκτη διασφαλίζοντας με τα βήματα αυτά τα βασικά πλεονεκτήματα της ΕΜΕ και της ΕΜΜΕ έναντι της LPME. Πιο αναλυτικά, το βασικό πλεονέκτημα της ΕΜΜΕ είναι η σημαντική μείωση στους χρόνους εκχύλισης συγκριτικά με την LPME. Ανάλογα με τη ρύθμιση του συστήματος εκχύλισης μπορεί να γίνει αρκετές φορές ταχύτερη από την LPME ενώ ταυτόχρονα με τη συμπληρωματική παράμετρο του ηλεκτρικού δυναμικού η ροή των ρύπων είναι ρυθμιζόμενη, ελέγχεται ο ρυθμός εκχύλισης αλλά και η εκλεκτικότητα του συστήματος.

Με τους παραπάνω τρόπους αυξάνεται η ακρίβεια και η ευαισθησία της μεθόδου καθώς είναι απλή και συζευγμένη με υγρή χρωματογραφία γεγονός που προσθέτει ακόμη ένα πλεονέκτημα : τους μικρούς χρόνους αναμονής για την ανάλυση.

Παρακάτω παρατίθεται σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της μικρό – εκχύλισης ηλεκτρομεμβράνης :



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση των βημάτων πειραματικής διαδικασίας της μικροεκχύλισης ηλεκτρομεμβράνης ΕΜΜΕ

6.8 Θεωρητικό Υπόβαθρο Μικρό – εκχύλισης Ηλεκτρομεμβράνης

Η αρχή της εκχύλισης για την ΕΜΜΕ είναι εντελώς διαφορετική από άλλες μεθόδους, καθώς εργαστηριακές μετρήσεις έχουν δείξει ότι η διαφορά δυναμικού και η σύνθεση του οργανικού διαλύτη είναι οι σημαντικότεροι παράγοντες για επιτυχείς εκχυλίσσεις. Παρόλα αυτά η θεωρητική κατανόηση της διαδικασίας της εκχύλισης μέχρι τώρα δεν ήταν δυνατή και πρέπει να καθοριστεί προκειμένου να καταλάβει κανείς και να βελτιστοποιήσει τη μέθοδο της μικρο – εκχύλισης ηλεκτρομεμβράνης^[25]. Ο καθορισμός αυτός πραγματοποιείται με την ανάπτυξη μαθηματικών εκφράσεων για τη ροή στην υποστηριζόμενη υγρή μεμβράνη, SLM, στο σύστημα και η επιβεβαίωση τους μέσω των πειραματικών αποτελεσμάτων.

Υπολογισμός Ανάκτησης και Εμπλουτισμού

Η ανάκτηση (recovery, R) υπολογίστηκε σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση για κάθε ένωση :

$$R(\%) = \frac{n_{a, final}}{n_{d, initial}} \times 100 = \left(\frac{V_a}{V_d} \right) \left(\frac{C_{a, final}}{C_{d, initial}} \right) \times 100$$

Όπου $n_{d, initial}$ και $n_{a, final}$ είναι ο αριθμός mol των ενώσεων που είναι αρχικά παρούσες στο διάλυμα – δότη και ο αριθμός των mol των ενώσεων που συλλέγονται στο διάλυμα – δέκτη αντίστοιχα. V_a είναι ο όγκος της φάσης δέκτη, V_d είναι ο όγκος του διαλύματος – δότη, $C_{a, final}$ η τελική συγκέντρωση των ενώσεων στη φάση – δέκτη και $C_{d, initial}$ είναι η αρχική συγκέντρωση των ενώσεων μέσα στο δότη.

Ο εμπλουτισμός (enrichment, E) υπολογίζεται από την ακόλουθη εξίσωση για κάθε ένωση :

$$E = \left(\frac{C_{a, final}}{C_{d, initial}} \right)$$

Θεωρητικό Μοντέλο

Για να περιγραφεί η διαδικασία εκχύλισης αναπτύχθηκε ένα θεωρητικό μοντέλο που βασίστηκε στην εξίσωση ροής Nerst – Planck και αφορά τη ροή διαμέσω της μεμβράνης SLM. Το μοντέλο αποδεικνύει ότι το μέγεθος της διαφοράς δυναμικού, η ισορροπία ιόντων του συστήματος και η απόλυτη θερμοκρασία επηρεάζουν τη ροή των ενώσεων διαμέσω της SLM.

Η ροή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διαφορά δυναμικού εγκάρσια της μεμβράνης και το αυξημένη διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού οδηγεί σε αύξηση της ροής των ρύπων.

Η ιοντική ισορροπία, ορισμένη ως το γινόμενο των ιόντων στο διάλυμα – δότη διαιρεμένο με το γινόμενο των ιόντων στο διάλυμα – δέκτη, φαίνεται να επηρεάζει τη ροή ενώ υψηλή ιοντική συγκέντρωση στο διάλυμα – δέκτη σε σχέση με αυτήν στο διάλυμα – δότη ήταν επωφελής για υψηλή ροή^[27].

Η μεμβράνη SLM θεωρείται ως υγρό που δε μεταφέρει θερμότητα παρουσία ηλεκτρικού πεδίου (E). Η κατάσταση σταθερής ροής J_j μιας ιοντικής ένωσης j μέσω της SLM μπορεί να περιγραφεί από την εξίσωση ροής Nerst – Planck :

$$J_j = -D_j \frac{dc_j}{dx} + \frac{D_j z_j e E c_j}{kT} \quad (1)$$

Όπου D_j είναι ο συντελεστής διάχυσης για τον ιόν, z_j είναι το φορτίο του, c_j είναι η συγκέντρωση του ιόντος στην SLM, x είναι η απόσταση μεταξύ της SLM/διεπιφάνεια διαλύματος – δέκτη, k είναι η σταθερά Boltzmann, e το στοιχειώδες φορτίο και T είναι η απόλυτη θερμοκρασία. Το πρώτο μέλος της εξίσωσης (1) περιγράφει τη διάχυση της ιοντικής ένωσης στην SLM και το δεύτερο μέλος περιγράφει την ηλεκτροκινητική μεταφορά. Για το σύστημα της μεθόδου EMME, πολλά διαφορετικά ιόντα είναι παρόντα και η ροή κάθε ιόντος μπορεί να περιγραφεί από την εξίσωση (1)^[25,27].

Η προκύπτουσα κατάσταση σταθερής ροής μιας i κατιονικής ένωσης, J_i μπορεί να υπολογιστεί και από μια τροποποιημένη εξίσωση του Nernst – Planck :

$$J_i = -\frac{D_i}{h} \left(1 + \frac{\nu}{\ln \chi} \right) \left(\frac{\chi - 1}{\chi - \exp(-\nu)} \right) (c_i - c_{i0} \exp(-\nu)) \quad (2),$$

όπου D_i είναι ο συντελεστής διάχυσης για το ιόν, h το πάχος της μεμβράνης, ν η αδιάστατη κινητήρια δύναμη που ορίζεται στην εξίσωση (3), χ ο λόγος της ολικής ιοντικής συγκέντρωσης στο διάλυμα – δότη προς τη συγκέντρωση στο διάλυμα – δέκτη.

Στο τέλος της εξ. (2) οι συγκεντρώσεις που αναγράφονται για την ένωση i είναι αυτές στη διεπιφάνεια μεταξύ της μεμβράνης SLM και του διαλύματος – δότη αντίστοιχα ^[25,27].

Η κινητήρια δύναμη ν ορίζεται από την ακόλουθη εξίσωση (3):

$$\nu = \frac{z_i e \Delta \phi}{kT} \quad (3),$$

όπου z_i είναι το φορτίο της i κατιονικής ένωσης, e είναι το στοιχειώδες φορτίο, $\Delta \phi$ είναι το ηλεκτρικό δυναμικό εγκάρσια της SLM, k η σταθερά Boltzmann και T είναι η θερμοκρασία.

7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

7.1 Αντιδραστήρια

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

- Ethylparaben καθαρότητας 99%, Propylparaben καθαρότητας 99%, Butylparaben καθαρότητας 99% του οίκου Sigma – Aldrich
- Methylparaben του οίκου Supelco καθαρότητας 98.3%
- Acetone (Analytical reagent grade) του οίκου Fischer Scientific
- Methanol με βαθμό καθαρότητας, Riedel-de-Häen για Υγρή Χρωματογραφία (LC/MS grade)
- Οξικό Αμμώνιο (Ammonium Acetate) του οίκου Fluka
- Acetonitrile (Analytical Grade) του οίκου Fluka, Riedel-de-Häen

Χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό από σύστημα καθαρισμού ύδατος (EASYPure®RF) το οποίο προμηθεύτηκε από την Barnstead/Thermolyne Corporation (Dubuque, IO, USA).

7.2 Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων

Σημαντικό στάδιο για τη σωστή διαξαγωγή της μεθόδου είναι η ακριβής και σωστή παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων (stock solution). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: αφού ζυγίστηκε σε ζυγαριά ακριβείας η κάθε ουσία ξεχωριστά (25mg), τοποθετήθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL που περιείχε διάλυμα ακετονιτρίλιου/νερού σε αναλογία 25/75%, δηλαδή η τελική συγκέντρωση του προτύπου να είναι 1 mg/mL ή 1000 ppm mix paraben. Αργότερα, χωρίστηκε ολόκληρη η ποσότητα του πρότυπου σε καθαρά φυαλίδια τα οποία κλείνουν με βιδωτό πώμα και τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη σε σκοτεινές συνθήκες. Τα πρότυπα εργασίας κατασκευάζονταν καθημερινά στα επιθυμητά επίπεδα συγκεντρώσεων λαμβάνοντας την απαραίτητη ποσότητα από τα stock solutions με μικροσύριγγα.

7.3 Όργανα – Συσκευές

- Κοίλη μεμβράνη πολυπροπυλενίου (Accurel Q 3/2) με πάχος τοιχωμάτων 200μm, εσωτερική διάμετρο 600μm, της Membrana Wuppertal, Germany
- Γυάλινο φιαλίδιο των 7 ml με βιδωτό πώμα (Supelco, Bellefonte, USA, screw cap vials)
- High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 710 SNR model Hamilton μικροσύριγγα των 100μl (Bellefonte, BA, USA)
- Platinum wire Electrodes : 0.25mm (0.010in) diameter, 99.9% metals basis and 0.5mm (0.02in) annealed, 99.95% metals basis by Alfa Aesar GmbH & CoKG, Germany
- Εργαστηριακό τροφοδοτικό μεταβλητής τάσης 0-50 VDC 0-3 A Mastech HY-5003 by AMAAD Hellas Electronics
- Φιαλίδιο Πολυπροπυλενίου Agilent screw cap vials clear 100/PK για εισαγωγή στο LC/MS
- Συσκευή Ανάδευσης Heidolph, MR Hei – Standard, Germany)
- Agilent 1200 high-performance liquid chromatography with ultraviolet detector
- Πλαστικά ακροφύσια (tips) Microloader της Eppendorf

Διαχωρισμός και Ανίχνευση Παραβενίων με HPLC-DAD

Μια πολύ διαδεδομένη αναλυτική τεχνική διαχωρισμού και ανίχνευσης για την ανάλυση παραβενίων σε περιβαλλοντικά δείγματα, καλλυντικές ή φαρμακευτικές ουσίες αλλά και βιολογικά δείγματα είναι η υγρή χρωματογραφία (liquid chromatography) σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους ορατού (Diode Array Detector).

Έτσι η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία με όργανο Agilent Technologies 1200 Series HPLC (Agilent Technologies, USA), που περιλαμβάνει δυαδική αντλία (binary pump), με ανιχνευτή Diode Array Detector, LC – DAD. Ως όγκος έγχυσης στο μηχάνημα ορίστηκαν τα 15μL που προέκυπταν από την εκχύλιση ενώ εισάγονται σε αναλυτική στήλη Betasil C18 (Μήκους 100mm, Μέγεθος σωματιδίων 5μm, i.d = 2.1mm) που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό και είναι θερμοστατικά ρυθμισμένη στους 25°C.



Εικόνα 13: Σύστημα Υγρού Χρωματογράφου συζευγμένου με ανιχνευτή υπεριώδους ορατού LC-DAD

7.4 Περιγραφή Προτεινόμενης Πειραματικής Διαδικασίας Προετοιμασίας Δειγμάτων - ΕΜΜΕ

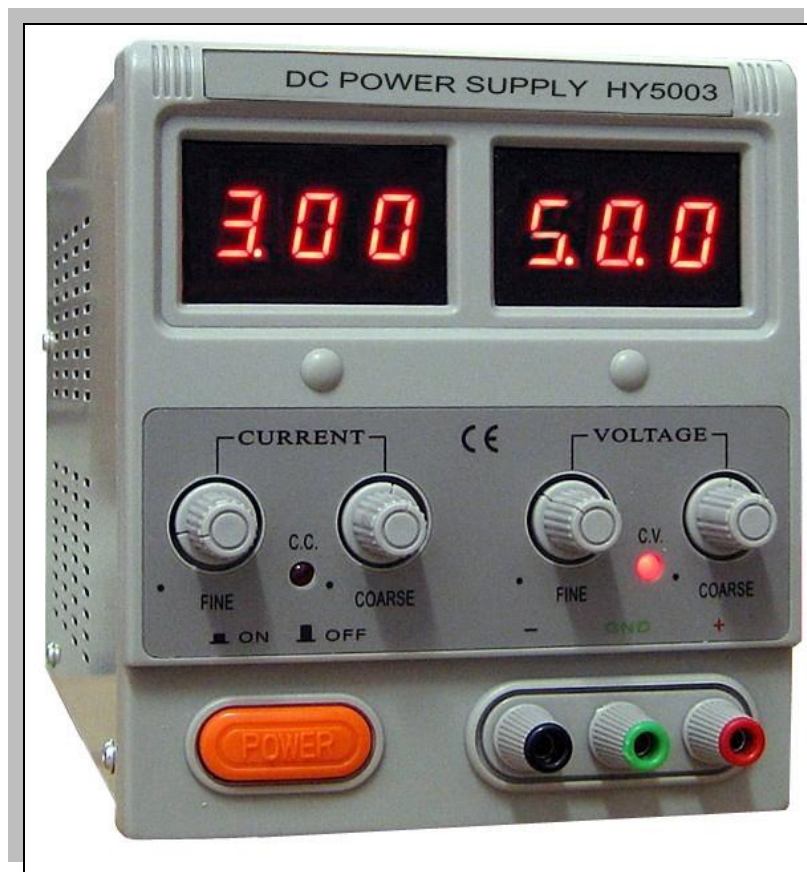
Για τη διεξαγωγή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη πολυπροπυλενίου με πάχος τοιχωμάτων 200μm, εσωτερική διάμετρο 600μm, της Membrana Wuppertal, Germany η οποία κομμένη σε μικρότερα κομμάτια εμβαπτιζόταν σε διάλυμα ακετόνης και ύστερα αφηνόταν να στεγνώσει την προηγούμενη ημέρα από το εκάστοτε πείραμα.

Η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με τα ακόλουθα βήματα – στάδια :

- ❖ Κόβονται τμήματα της κοίλας μεμβράνης πολυπροπυλενίου σε μήκος ίσο με 7 εκατοστά.
- ❖ Δύο πλαστικά ακροφύσια (tips) μήκους 6 εκατοστών περνούν μέσα από το ελαστικό διάφραγμα (septum) και το βιδωτο καπάκι του φιαλιδίου έτσι ώστε να είναι σε σταθερή θέση.
- ❖ Προσαρμόζεται η μεμβράνη στις δύο άκρες των πλαστικών σωλήνων σε σχήμα U έτσι ώστε να διασφαλίζεται ότι δε θα αποκολληθεί.
- ❖ Βυθίζεται η μεμβράνη στην οκτανόλη για περίπου 10 δευτερόλεπτα έτσι ώστε να εμβαπτιστούν οι πόροι της στο διαλύτη και να σχηματιστεί η «υποστηριζόμενη υγρή μεμβράνη» (SLM).
- ❖ Με καθαρή σύριγγα, σπρώχνεται το διάλυμα – δέκτης όγκου 25 μL, και pH ίσο με 5.5 μέσω των πλαστικών σωλήνων εντός της μεμβράνης.
- ❖ Τοποθετείται από το ημερήσιο υδατικό διάλυμα mix paraben μέσα σε γυάλινο φιαλίδιο ποσότητα ίση με 7mL και pH ίσο με 5.5 και ένας μικρός μαγνήτης μήκους 1,5 εκατοστών ο οποίος βοηθά στην ανάδευση.
- ❖ Τοποθετείται μέσα στο ένα πλαστικό tip και μέσα στη μεμβράνη το αρνητικό ηλεκτρόδιο πλατίνας διαμέτρου 0.25 χιλιοστών, προσέχοντας ώστε να μη σκιστεί η μεμβράνη.
- ❖ Βιδώνεται το καπάκι στο φιαλίδιο και τρυπώντας το septum από το καπάκι τοποθετείται το θετικό ηλεκτρόδιο διαμέτρου 0.5 χιλιοστών μέσα στο διάλυμα, έτσι ώστε να μην ακουμπά στη μεμβράνη ή στο μαγνήτη ή στα τοιχώματα του φιαλιδίου.
- ❖ Στερεώνεται το φιαλίδιο στον αναδευτήρα και συνδέονται τα ηλεκτρόδια με τη συσκευή τροφοδότησης ηλεκτρικού ρεύματος.

- ❖ Θέτουμε σε λειτουργία τον αναδευτήρα σε ταχύτητα 1000 rpm και το τροφοδοτικό σε δυναμικό ίσο με 50V και ρεύμα ίσο με 0.02 mA για χρονικό διάστημα ίσο με 15 λεπτά.
- ❖ Τέλος συλλέγουμε το διάλυμα – δέκτη με τη μικροσύριγγα από τη μεμβράνη κάνοντας χρήση της μεθόδου μικροεκχύλισης ηλεκτρομεμβράνης.

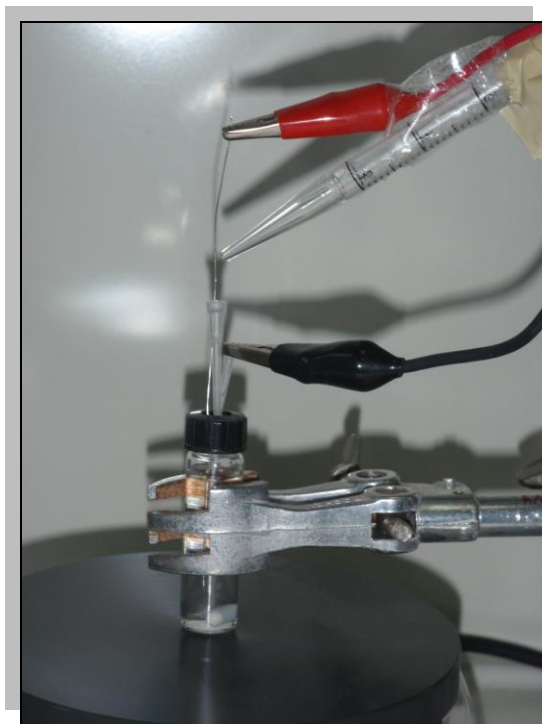
Έτσι με τον τρόπο αυτό επιλέχθηκε μια σειρά παραμέτρων που επηρεάζουν την ηλεκτροκινητική και μελετήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία με σκοπό να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης. Οι παράμετροι αυτές περιλαμβάνουν την επιλογή του οργανικού διαλύτη, την επιλογή του όγκου καθώς και του pH του υδατικού διαλύματος – δότη και του pH του διαλύματος δέκτη, την εφαρμογή του ηλεκτρικού δυναμικού και τη διάρκειά του, την ταχύτητα και τη διάρκεια ανάδευσης του δείγματος.



Εικόνα 14: Απεικόνιση τροφοδοτικού DC Power Supply που χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία ΕΜΜΕ



Εικόνα 15: Απεικόνιση συστήματος ανάδευσης και τροφοδότησης για τη διαδικασία μικροεκχύλισης ηλεκτρομεμβράνης ΕΜΜΕ



Εικόνα 16: Απεικόνιση συστήματος με το οποίο πραγματοποιήθηκε η πειραματική διαδικασία της μικροεκχύλισης ηλεκτρομεμβράνης



Εικόνα 17: Μικροσύριγγα που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας ΕΜΜΕ στο εργαστήριο



Εικόνα 18: Ειδικά Φιαλίδιο μέσα στα οποία τοποθετείται το διάλυμα - δέκτης ύστερα από τη διαδικασία μικροεκχύλισης ηλεκτρομεμβράνης



Εικόνα 19: Θήκη των ειδικών φιαλιδίων μέσα στον Υγρό Χρωματογράφο

8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

8.1 Διαχωρισμός και Ανίχνευση Παραβενίων με HPLC-DAD

Η κινητή φάση ορίστηκε ως μείγμα από ως 5mM υδατικό διάλυμα οξικού αμμωνίου (5mM NH_4Oac) και καθαρής μεθανόλης (MeOH) με ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ίση με 0.250 mL/min. Η αναλογία μεταξύ των δύο διαλυμάτων ξεκινά με 70% οξικό αμμώνιο και 30% μεθανόλη για 21 λεπτά, ύστερα στο 22^ο λεπτό συνεχίζει με 35% οξικό αμμώνιο και 65% μεθανόλη για 3 λεπτά ενώ στο 25^ο λεπτό αυξάνεται στο 70% οξικού αμμωνίου και 30% μεθανόλης (αρχικές συνθήκες) και τέλος αφήνονται 7 λεπτά χρόνος σταθεροποίησης της πίεσης. Το μήκος κύματος ανίχνευσης είχε ρυθμιστεί στα 254 nm έως 264nm.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα ποσοστά έκλουσης και οι αναλογίες τους :

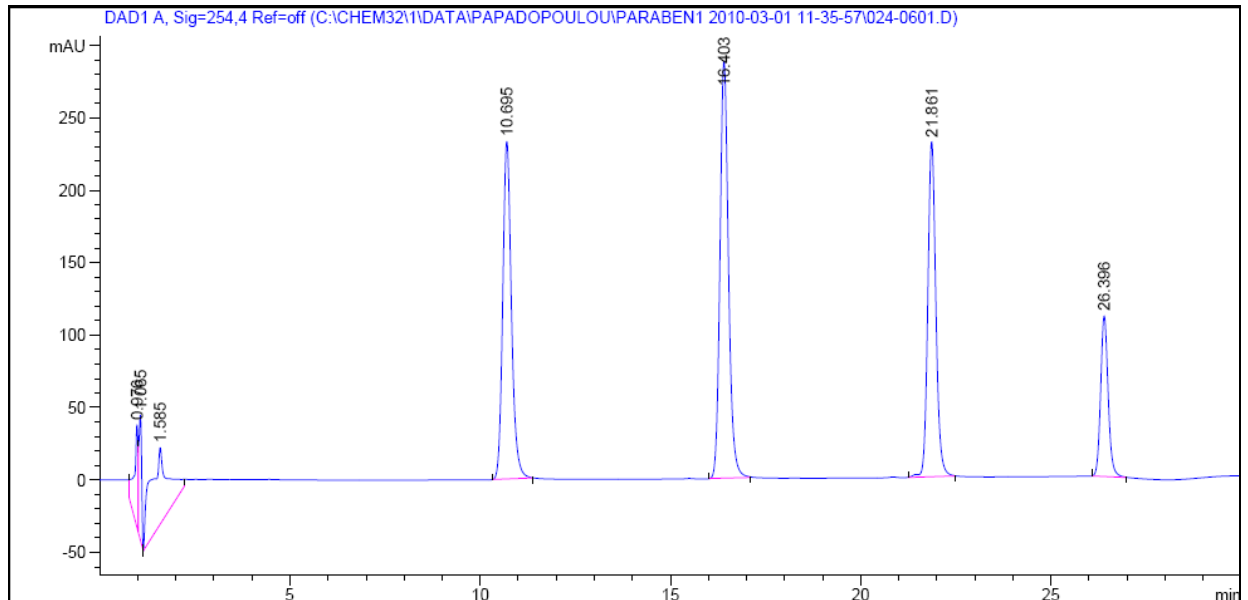
Πίνακας 1: Βαθμιαία Μεταβολή της Σύστασης του μίγματος Διαλυτών:

Time	%B (5mM NH_4Oac)	%A (MeOH)
0	70	30
22	35	65
25	70	30

Έπειτα από μεταβολές που πραγματοποιήθηκαν στην αναλογία οξικού αμμωνίου (NH_4Oac) και μεθανόλης (MeOH) βρέθηκε η σύσταση που έπρεπε να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να επιτευχθεί ο επιτυχής διαχωρισμός των τεσσάρων παραβενίων από το διάλυμα. Έτσι, με χρήση των ανωτέρω συνθηκών παρουσιάζεται το παρακάτω χρωματογράφημα του διαχωρισμού των τεσσάρων παραβενίων που εξετάστηκαν ως προς την ανάλυση και εκκλύονται σε χρόνο 10.5 λεπτών το methylparaben, 16.1 το ethylparaben, 21.4 το propylparaben, 25.9 το butylparaben.

Το χρωματογράφημα που φαίνεται απεικονίζει τη χρήση των βέλτιστων συνθηκών : 7mL όγκο υδατικού διαλύματος – δότη σε pH ίσο με 5.5, pH του διαλύματος – δέκτη ίσο με 5.5, χρήση οκτανόλης για βύθιση της σωληνοειδούς μεμβράνης μήκους 7 εκατοστών, ηλεκτρικό δυναμικό ίσο με 50 Volt και ρεύμα 0.02 mA, χρόνο ανάδευσης ίσο με 15 λεπτά και ταχύτητα ανάδευσης ίση με 1000 rpm.

Το χρωματογράφημα σε συγκέντρωση παραβενίων ίση με 500 ppb ύστερα από την αναλυτική διαδικασία είναι της μορφής :



Διάγραμμα 1 : Χρωματογράφημα στο LC – DAD των ενώσεων MP, EP, PP, BP

Το διάγραμμα αυτό αποδεικνύει ότι και οι τέσσερις ενώσεις των παραβενίων μεταφέρθηκαν αποτελεσματικά διαμέσω της τεχνητής μεμβράνης και παγιδεύτηκαν στο διάλυμα – δέκτη με την εφαρμογή του ηλεκτρικού δυναμικού.

8.2 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ : ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣ – ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

8.2.1 Επιλογή Μεμβράνης SLM

Σημαντική παράμετρος που καθορίζει σε πολύ μεγάλο βαθμό την επιτυχία της μεθόδου είναι η επιλογή του καταλληλότερου οργανικού διαλύτη εκχύλισης που θα χρησιμοποιηθεί για τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, καθώς αυτός πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως «υγρή υποστηριζόμενη μεμβράνη» - «supported liquid membrane» SLM στη μικροεκχύλιση ηλεκτρομεμβράνης.

Αρχικά ο συντελεστής κατανομής των ενώσεων στην SLM θα πρέπει να είναι υψηλότερος από ότι στο υδατικό μέσο έτσι ώστε να επιτρέπεται η μεταφορά μάζας των ρύπων στο διάλυμα – δέκτη διαμέσω της SLM. Επιπρόσθετα θα πρέπει ο διαλύτης να είναι μη – διαλυτός στο νερό (ή να έχει χαμηλή διαλυτότητα σε αυτό) έτσι ώστε να αποφευχθούν απώλειες από τους πορώδεις τοίχους της σωληνοειδούς μεμβράνης (hollow fiber) και διάλυση των ενώσεων μέσα στο δείγμα κατά τη δειγματοληψία. Τα κριτήρια επιλογής είναι παρόμοια με αυτά που χρησιμοποιούνται στην LLE ή στην LPME μόνο που στην παρούσα περίπτωση οι ρύποι είναι ιόντα στο συγκεκριμένο pH που εξετάστηκε αρχικά. Ακόμη ο διαλύτης θα πρέπει να έχει τέτοια πολικότητα που να ταιριάζει με αυτήν της ίνας από πολυπροπυλένιο, ώστε να μπορεί εύκολα να ακινητοποιηθεί ακλόνητα στους πόρους της. Συγκεκριμένα στην EMME το διάλυμα – δότης, η SLM και το διάλυμα – δέκτης θα πρέπει να πληρούν ένα ηλεκτρικό κύκλωμα. Για το λόγο αυτό ο διαλύτης θα πρέπει να έχει επαρκή ηλεκτρική αγωγιμότητα ώστε να επιτρέπει την ηλεκτροκινητική μεταφορά των ενώσεων μέσω της SLM στο διάλυμα – δέκτη και ταυτόχρονα να επιτρέπει τη διείσδυση του ηλεκτρικού πεδίου στο σύστημα^[1,34].

Μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων υπάρχει περίπτωση δημιουργίας φουσαλίδων (bubble formation), γεγονός που ενισχύεται αυξάνοντας τη ροή του ρεύματος στο σύστημα, μειώνοντας δηλαδή την ηλεκτρική αντίσταση της μεμβράνης. Με άλλα λόγια προκειμένου να κατασταλεί ο σχηματισμός των

φυσαλίδων, η ηλεκτρική αγωγιμότητα της μεμβράνης SLM δεν πρέπει να είναι υψηλή αλλά περισσότερο ένας συμβιβασμός μεταξύ της αποτελεσματικότητας της μεταφοράς των ενώσεων και της τάσης σχηματισμού φυσαλίδων^[34].

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω κριτήρια εξετάστηκαν διάφοροι διαλύτες (τολουένιο, χλωροβενζόλιο, οκτανόλη και ιοντικός διαλύτης) οι οποίοι διέφεραν ως προς την πολικότητα και τη διαλυτότητα τους στο νερό. Τα δείγματα είχαν επιμολυνθεί με μείγμα παραβενίων σε συγκέντρωση 1000 μg/L, με pH του διαλύματος δότη ίσο με 5.5 και pH του διαλύματος δέκτη ίσο με 5.5, ανάδευση με ταχύτητα 1000 rpm για χρονικό διάστημα 15 λεπτών και ηλεκτρικό δυναμικό 50 Volt.

Από όλους τους διαλύτες που εξετάστηκαν παρατηρήθηκε ότι ο μόνος διαλύτης που οδήγησε στην επιτυχή ανάκτηση των παραβενίων και κατέστησε εφικτή τη διαδικασία της μικρο - εκχύλισης ήταν η οκτανόλη. Επίσης μπορούσε εύκολα να ακινητοποιηθεί στους πόρους της μεμβράνης σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα χωρίς να εμφανίζει σημαντικές απώλειες κατά την εκχύλιση και εμφάνισε και υψηλή επιλεκτικότητα, γεγονός που οφείλεται στη συμβατότητα της με τα παραβένια, όσον αφορά στην πολικότητά της. Συμπληρωματικά με το τολουένιο και το χλωροβενζόλιο παρατηρήθηκε εμφάνιση φυσαλίδων τόσο εξωτερικά της μεμβράνης SLM όσο και στο διάλυμα – δέκτη.

Με βάση τα παραπάνω επιλέχθηκε η οκτανόλη ως η βέλτιστη μεμβράνη SLM στην προκειμένη μέθοδο ανάλυσης των παραβενίων.

8.2.2 Επίδραση του pH

Είναι ευρέως γνωστό ότι το pH επηρεάζει σημαντικά τον καταμερισμό υδροφοβικών χημικών ενώσεων στην οκτανόλη καθώς η μετατόπιση της ισορροπίας σχετίζεται με τη διαλυτότητα όξινων ή βασικών ενώσεων και μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης δηλαδή

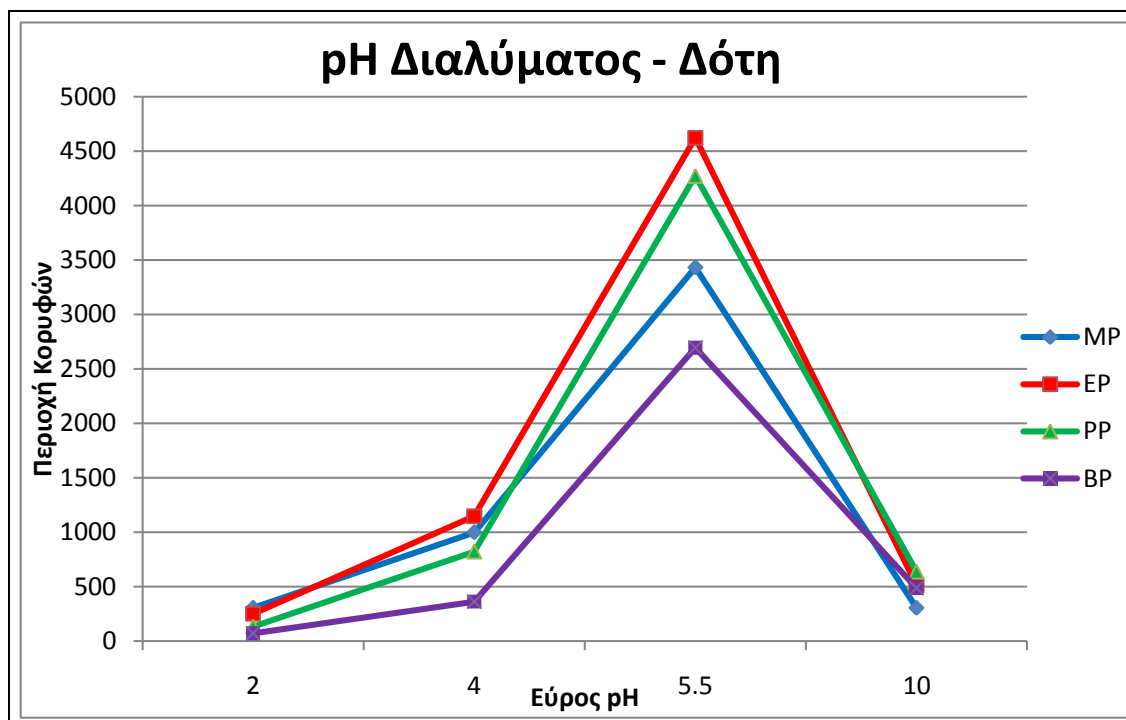
αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές παραμέτρους για τη βελτιστοποίηση της μικροεκχύλισης.

Στην ΕΜΜΕ ο καθορισμός της σύστασης των φάσεων των διαλυμάτων δότη και δέκτη έχει πολύ μεγάλη σημασία αφού οδηγεί σε αυξημένους λόγους κατανομής και διασφαλίζει υψηλούς συντελεστές εμπλουτισμού και ανάκτησης για τις ενώσεις – στόχους.

Για το λόγο αυτό δοκιμάστηκαν διάφορες τιμές του pH τόσο του διαλύματος – δότη (donor) όσο και του διαλύματος – δέκτη (acceptor) προκειμένου να προσδιοριστούν οι βέλτιστες.

8.2.2.1 Επίδραση του pH του διαλύματος – δότη (donor)

Σε 7 mL διαλύματος υπερκάθαρου νερού στο οποίο έχει γίνει προσθήκη 1 mg/L των ενώσεων μέθυλ-,έθυλ-,προπυλ-,βουτυλ-παραβενίων ρυθμίστηκε το pH στις τιμές 2, 4, 5.5 και 10. Ακολούθησε εμβάπτιση της σωληνοειδούς μεμβράνης (fiber) στην οκτανόλη για 10 sec, εισαγωγή 25 μ L υπερκάθαρου νερού (με pH ίσο με 5.5) ως διάλυμα - δέκτης στο εσωτερικό του hollow fiber και τοποθέτησή του στο διάλυμα, ανάδευση του διαλύματος στα 1000 rpm με ταυτόχρονη εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού ίσο με 50 Volt.



Διάγραμμα 2: Επίδραση pH του διαλύματος – δόση στην αποδοτικότητα της ΕΜΜΕ

Στο διάγραμμα 2 φαίνεται η μεταβολή της ανταπόκρισης του μηχανήματος συναρτήσει του pH. Όπως φαίνεται η βέλτιστη τιμή του pH του διαλύματος – δόση είναι η τιμή 5.5. Η τιμή αυτή είναι λογική καθώς και για τα τέσσερα παραβένια η σταθερά διάστασης κυμαίνεται από 7.91 έως 8.47, δηλαδή είναι υδρόφοβες βασικές ενώσεις και συμπεραίνουμε ότι είναι ιονισμένες στην τιμή 5.5 οπότε μεταφέρονται από το υδατικό διάλυμα – δόση στην οργανική φάση της SLM.

Καθώς το pH στο διάλυμα αυξάνεται σε τιμές που ξεπερνούν τις τιμές του pK_a των παραβενίων παρατηρείται σημαντική μείωση στη μικρο – εκχύλιση αυτών γεγονός που συμβαίνει εξαιτίας της αποπρωτονίωσης των ενώσεων (deprotonation – B)^[34]. Η υδροφοβικότητα επίσης παίζει πολύ σημαντικό ρόλο καθώς η σειρά μικρο - εκχύλισης των ενώσεων είναι : $MP > EP > PP > BP$, δηλαδή όσο μεγαλύτερη η αλυσίδα της ένωσης τόσο χαμηλότερο το σήμα που φαίνεται στο μηχανήμα HPLC^[5].

Σε τιμές του pH μικρότερες της τιμής pK_a και συγκεκριμένα στην περιοχή μεταξύ 2 έως 4 παρατηρείται πολύ μικρή απόκριση του

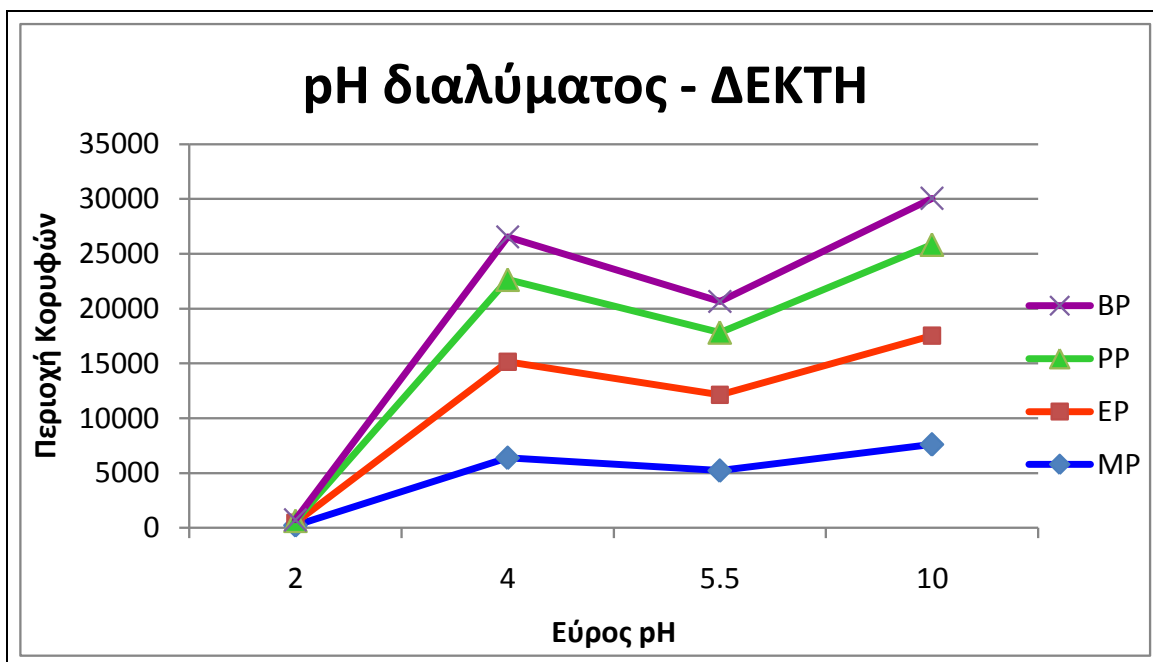
μηχανήματος, γεγονός που οφείλεται στο ότι στο συγκεκριμένο εύρος pH οι ενώσεις υδρολύονται και δεν είναι δυνατό να περάσουν στην οργανική φάση της SLM. Πιο αναλυτικά η τιμή του pH στο διάλυμα δότη ρυθμίστηκε στην όξινη περιοχή έτσι ώστε να διασφαλιστεί ότι οι εν λόγω βασικές ενώσεις θα είναι πρωτονιωμένες (BH^+). Με την εφαρμογή της διαφοράς του ηλεκτρικού δυναμικού τα πρωτονιωμένα παραβένια ξεκινούν την ηλεκτροκινητική μεταφορά από το διάλυμα δότη και κατευθύνονται προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο που είναι τοποθετημένο στο διάλυμα – δέκτη.

Ανάλογη συμπεριφορά βασικών ενώσεων έχουν παρατηρήσει και άλλες ομάδες επιστημόνων που αναλύουν φαρμακευτικές ενώσεις όπως μεθαδόνη (methadone), πεθιδίνη (pethidine) και λοπεραμίδη (loperamide) ^[34]. Επίσης πρόσφατη δημοσίευση βελτιστοποίησε τη συμπεριφορά παραβενίων με τη μέθοδο HF –LPME συζευγμένη με HPLC και αναφέρει ομοίως ότι η μέγιστη απόκριση του διαλύματος δότη γίνεται στο pH 5.5 ενώ σε χαμηλότερες τιμές το σήμα και η απόδοση της μικρο – εκχύλισης μειώνονται κατά πολύ. (T.A. Msagati et al)^[5].

Με βάση τα παραπάνω αποφασίστηκε να χρησιμοποιείται η τιμή 5.5 για το pH του διαλύματος δότη σε όλα τα επόμενα πειράματα.

8.2.2.2 Επίδραση του pH του διαλύματος – δέκτη (acceptor)

Για τη μελέτη της επίδρασης του pH του διαλύματος – δέκτη παρασκευάστηκαν διαλύματα υπερκάθαρου νερού στα οποία ρυθμίστηκε το pH στις τιμές 2, 4, 5.5, 10, και 12. Η τιμή του διαλύματος – δότη είχε ρυθμιστεί να είναι ίση με 5.5, με συγκέντρωση παραβενίων ίση με 1 mg/L, ύστερα έγινε εμβάπτιση της μεμβράνης στην οκτανόλη για 5 sec, ακολούθησε η εισαγωγή 25 μ L υπερκάθαρου νερού ως διάλυμα - δέκτης στη μεμβράνη και τοποθέτησή της στο διάλυμα, ανάδευση στα 1000 rpm για 15 λεπτά και ταυτόχρονη εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού ίσο με 50 Volt.



Διάγραμμα 3: Επίδραση pH του διαλύματος – δέκτη στην αποδοτικότητα της ΕΜΜΕ

Τα αποτελέσματα παρατίθενται στο διάγραμμα 3. Όπως φαίνεται η βέλτιστη τιμή του pH του διαλύματος – δέκτη για τις συγκεκριμένες ουσίες βρέθηκε να είναι η τιμή 5.5 καθώς στην τιμή αυτή μπορεί να είχαμε ελαφρώς μικρότερες αποκρίσεις του μηχανήματος από ότι στην τιμή του pH ίση με 4 αλλά υπήρχαν μικρότερες αποκλίσεις όσον αφορά τις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Στην τιμή 5.5 οι ενώσεις μεταφέρονται από την οργανική φάση της SLM στο υδατικό διάλυμα δέκτη εξαιτίας της επίδρασης του ηλεκτρικού δυναμικού και όχι λόγω της διαφοράς pH και παθητικής διάχυσης όπως στη μέθοδο της LPME. Σε τιμές μεγαλύτερες του 7 φαίνεται ότι η απόδοση της μεθόδου είναι μεγαλύτερη, γεγονός που οφείλεται στη διαφορά του pH μεταξύ δότη και δέκτη αλλά επειδή ήταν επιθυμητό να εξεταστεί μόνο το ηλεκτρικό δυναμικό ως κινητήρια δύναμη και όχι συμπληρωματικά με τη διαφορά του pH, επιλέχθηκε η τιμή 5.5 για το διάλυμα δέκτη και για τα επόμενα πειράματα.

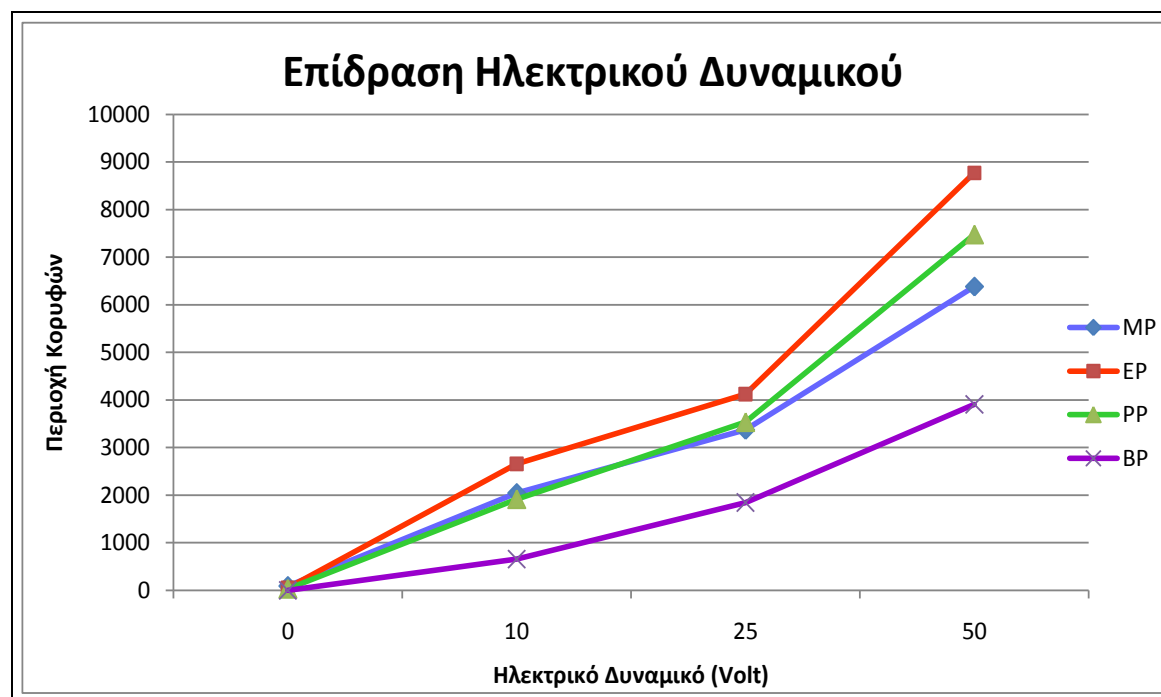
Πιο αναλυτικά, από την οργανική φάση της SLM, οι ενώσεις διέρχονται από τη διεπιφάνεια και εισέρχονται στο υδατικό διάλυμα δέκτη. Στο δέκτη η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (V/cm) είναι σχετικά χαμηλή, όπως αναφέρεται και σε βιβλιογραφικές πηγές των Petersen και Rasmussen, αλλά η ισχυρή

πρωτονίωση των ενώσεων έχει ως αποτέλεσμα την ηλεκτροκινητική μεταφορά^[34,35].

8.2.3 Επιλογή Ηλεκτρικού Δυναμικού

Η κύρια δύναμη μεταφοράς των ενώσεων στην ΕΜΜΕ είναι η ηλεκτροκινητική μεταφορά από το διάλυμα – δότη (donor) στο διάλυμα – δέκτη (acceptor) μέσα από την κοίλα σωληνοειδή μεμβράνη, γεγονός που εξαρτάται άμεσα από το εφαρμοζόμενο δυναμικό.

Έτσι για τη συγκεκριμένη παράμετρο παρασκευάστηκαν διαλύματα 7 mL υπερκάθαρου νερού (σε pH ίσο με 5.5) στα οποία είχαν προστεθεί οι ενώσεις σε συγκέντρωση 1 mg/L και χρησιμοποιήθηκε διάλυμα υπερκάθαρου νερού (σε pH ίσο με 5.5) ως δέκτης. Ακολούθησε η εμφύσηση της σωληνοειδούς μεμβράνης στην οκτανόλη για 10 sec, εισαγωγή 25 μ L υπερκάθαρου νερού ως διάλυμα - δέκτης στη μεμβράνη και τοποθέτησή της στο διάλυμα και ύστερα έγινε ανάδευση στα 1000 rpm για 15 λεπτά. Το ηλεκτρικό δυναμικό μετρήθηκε σε εύρος από 0 έως 50 Volt για τη μελέτη επίδρασης του δυναμικού στη μικρό – εκχύλιση.

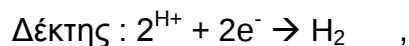
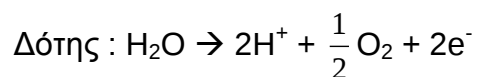


Διάγραμμα 4: Επίδραση ηλεκτρικού δυναμικού στην αποδοτικότητα της ΕΜΜΕ

Στην περίπτωση του μηδενικού δυναμικού οι εν λόγω ρύποι δεν εκχυλίστηκαν σχεδόν καθόλου ενώ με την εφαρμογή ακόμα και πολύ χαμηλού δυναμικού της τάξης των 10 Volt υπήρχε εμφανής βελτίωση της απόδοσης της εκχύλισης και σημαντική ποσότητα ρύπων ανακτήθηκε.

Η χαρακτηριστική επίδραση του δυναμικού στην απόδοση της εκχύλισης αποδεικνύει ότι η διαφορά του δυναμικού μεταξύ των ηλεκτροδίων (ανόδου – καθόδου) αποτελεί την κινητήρια δύναμη μεταφοράς ρύπων της μεθόδου μικροεκχύλισης ηλεκτρομεμβράνης ΕΜΜΕ αποκλείοντας την επίδραση της διαφοράς του pH μεταξύ δότη και δέκτη ως δύναμη μεταφοράς των ενώσεων όπως είναι στην LPME.

Σε θεωρητικό πλαίσιο η αποδοτικότητα της μεθόδου εκχύλισης ΕΜΜΕ αυξάνεται με την αύξηση του ηλεκτρικού δυναμικού. Παρόλα αυτά είναι ήδη γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι σε υψηλές τιμές δυναμικού, π.χ 300 Volt, συχνά δε σημειώνεται καμία ανάκτηση ενώσεων ή παρατηρείται εμφάνιση φυσαλίδων μέσα στη μεμβράνη γεγονός που οδηγεί σε ανεπιθύμητα μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων και προβλήματα αστάθειας^[6,34]. Συμπληρωματικά είναι επικίνδυνη η χρήση τόσο υψηλού ηλεκτρικού δυναμικού καθώς έχουν σημειωθεί αναφορές στη βιβλιογραφία για σπίθες κατά την πειραματική διαδικασία. Δεδομένου ότι η μεμβράνη SLM και οι εν λόγω ενώσεις είναι αδρανείς όσον αφορά τις αντιδράσεις των ηλεκτροδίων, συμβαίνουν οι ακόλουθες διεργασίες στα ηλεκτρόδια στο διάλυμα – δότη και δέκτη αντίστοιχα:

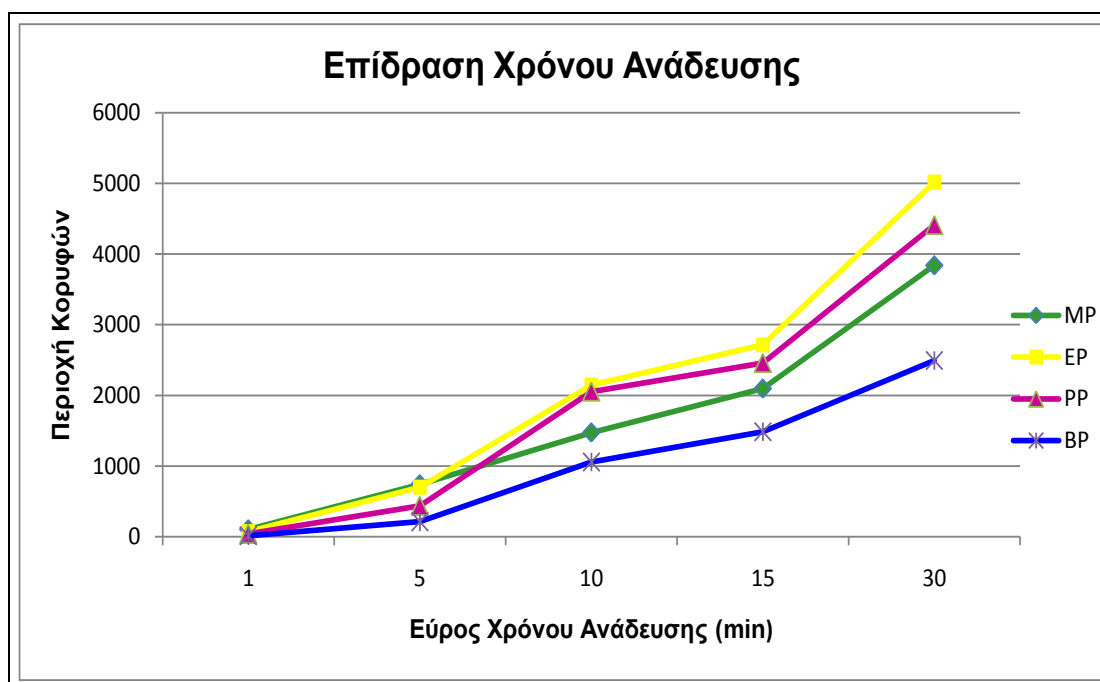


Όπου O_2 και H_2 δημιουργούνται στα δύο ηλεκτρόδια παράγοντας φυσαλίδες (bubble formation), γεγονός που αυξάνεται αυξάνοντας τη ροή του ρεύματος στο σύστημα.

Με το ηλεκτρικό δυναμικό των 50 Volt, η ένταση του ρεύματος στο σύστημα ήταν στα 0.02 mA, και όπως φαίνεται και από το διάγραμμα 4 αυτή είναι η βέλτιστη για τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας.

8.2.4 Επιλογή Χρόνου Ανάδευσης

Η ανάδευση του δείγματος αυξάνει γενικά την εκχύλιση και μειώνει το χρόνο που απαιτείται για να φτάσει το σύστημα σε σταθερή κατάσταση (steady state). Παρατηρήθηκε ότι η χρήση του οργάνου ανάδευσης αύξησε δραματικά την απόκριση του οργάνου Υγρής Χρωματογραφίας για όλες τις περιπτώσεις. Σε δείγμα 7 ml υπερκάθαρου νερού πραγματοποιήθηκε προσθήκη των ενώσεων σε συγκέντρωση 1 mg/L, εμβάπτιση της σωληνοειδούς μεμβράνης στην οκτανόλη για 10 sec, εισαγωγή 25 µL υπερκάθαρου νερού ως διάλυμα - δέκτης στη μεμβράνη και τοποθέτησή της στο διάλυμα, ανάδευση στα 1000 rpm και ταυτόχρονη εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού στα 50 Volt.



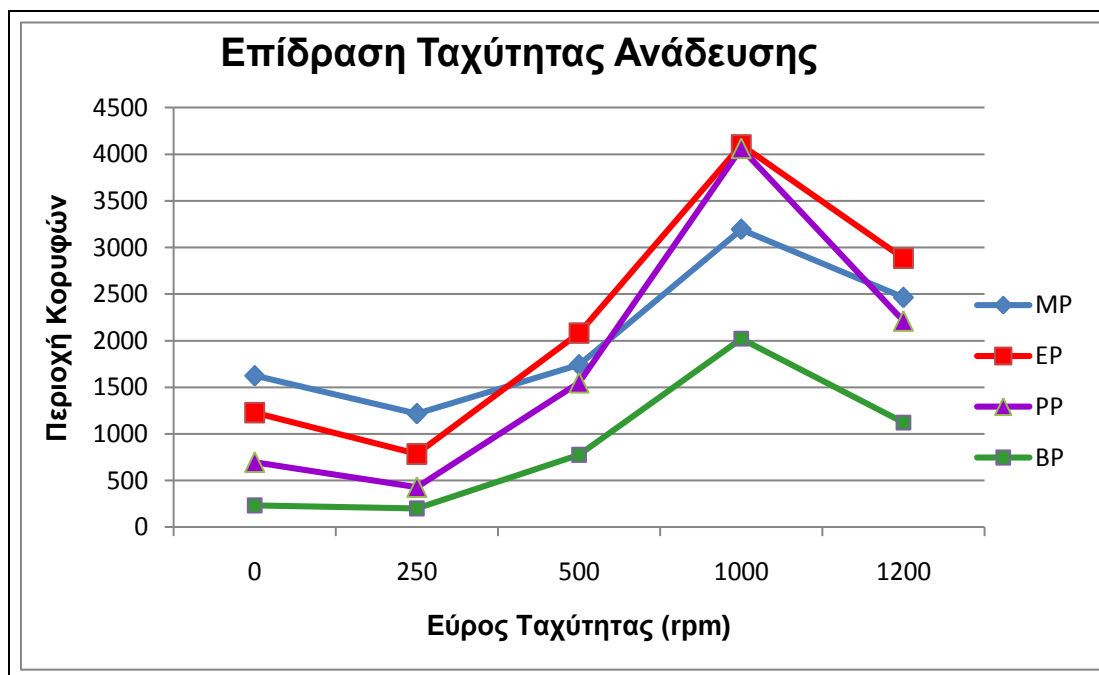
Διάγραμμα 5: Επίδραση χρόνου ανάδευσης στην αποδοτικότητα της ΕΜΜΕ

Προκειμένου να μελετηθεί η ηλεκτροκινητική μεταφορά των παραβενίων με την πάροδο του χρόνου, εξετάστηκε η επίδραση του χρόνου ανάδευσης που ποίκιλε από 1 έως 30 λεπτά στα 1000 rpm. Στο διάγραμμα 5 δίνονται τα αποτελέσματα όπου η ποσότητα των παραβενίων που εκχυλίστηκε αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Παρόλα αυτά επιλέχθηκε ως βέλτιστη τιμή αυτή των 15 λεπτών καθώς προέκυπταν αισθητά μικρότερες τιμές σχετικών τυπικών αποκλίσεων μεταξύ των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για κάθε τιμή.

Δεν μελετήθηκαν χρόνοι ανάδευσης ανώτεροι των τριάντα λεπτών καθώς μετά την πάροδο τόσο μεγάλων χρονικών διαστημάτων θα είχε εξατμιστεί η οργανική φάση της οκτανόλης οπότε δε θα υπήρχε η μεμβράνη SLM ώστε να πραγματοποιηθεί η μεταφορά των παραβενίων σε αυτή και να ολοκληρωθεί η μέθοδος ΕΜΜΕ.

8.2.5 Επιλογή Ταχύτητας Ανάδευσης

Το επόμενο βήμα ήταν η μελέτη της επίδρασης του ρυθμού ανάδευσης στην μικρο - εκχύλιση των παραβενίων και πραγματοποιήθηκαν πειράματα με την ταχύτητα του οργάνου ανάδευσης ώστε να βρεθεί η βέλτιστη τιμή. Σε δείγμα 7 ml υπερκάθαρου νερού (με pH ίσο με 5.5) πραγματοποιήθηκε προσθήκη των ενώσεων σε συγκέντρωση 1 mg/L, εμβάπτιση της σωληνοειδούς μεμβράνης στην οκτανόλη για 10 sec, εισαγωγή 25μL υπερκάθαρου νερού ως διάλυμα – δέκτης (με pH ίσο με 5.5) στη μεμβράνη και τοποθέτησή της στο διάλυμα, εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού στα 50 Volt και ταυτόχρονη ανάδευση για χρονικό διάστημα 15 λεπτών σε ταχύτητες: 0, 250, 500, 1000 και 1200 rpm .



Διάγραμμα 6: Επίδραση ταχύτητας ανάδευσης στην αποδοτικότητα της ΕΜΜΕ

Το κύριο αποτέλεσμα της ανάδευσης έγκειται στη μείωση του πάχους του οριακού στρώματος στη διεπιφάνεια μεταξύ του διαλύματος δότη και της SLM, γεγονός που ενδυναμώνεται από την εφαρμογή του δυναμικού. Έτσι απεικονίζεται στο διάγραμμα 6 πως όσο η ταχύτητα ανάδευσης αυξάνεται μειώνεται το πάχος του οριακού στρώματος (boundary layer) και επηρεάζεται θετικά η μικρο – εκχύλιση των παραβενίων^[34,35].

Επίσης φαίνεται από το διάγραμμα 6 ότι το πειραματικό σημείο 0 ανταποκρίνεται, γεγονός που είναι λογικό αφού ασκείται η κινητήρια δύναμη του ηλεκτρισμού. Αυξάνοντας όμως την ταχύτητα από 250 σε 1000 rpm παρατηρείται σημαντική αύξηση στην απόκριση του μηχανήματος. Βασιζόμενοι στις παρατηρήσεις αυτές επιλέχθηκε ως βέλτιστη ταχύτητα ανάδευσης αυτή των 1000 rpm.

Όπως αναμενόταν και βάση πληθώρας δεδομένων από τη βιβλιογραφία, στα 1200 rpm η ανάδευση δεν είναι αποδοτική και επιφέρει μεγάλες σχετικές τυπικές αποκλίσεις στα πειραματικά δεδομένα, καθιστώντας τη μικρο – εκχύλιση ηλεκτρομεμβράνης λιγότερο αποδοτική από ότι στα 1000 rpm.

Παρακάτω συγκεντρώνονται όλες οι βέλτιστες συνθήκες της πειραματικής διαδικασίας :

Χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση παραβενίων ίση με 1 mg/L και η οκτανόλη βρέθηκε να λειτουργεί ως μεμβράνη SLM αποτελεσματικά για τη μέθοδο ΕΜΜΕ. Το βέλτιστο pH του διαλύματος δότη αλλά και του δέκτη βρέθηκε να είναι στο 5.5 ενώ ο χρόνος ανάδευσης ήταν τα 15 λεπτά. Το διάλυμα αναδεύονταν με ταχύτητα 1000 rpm προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μικρο – εκχύλιση ηλεκτρομεμβράνης.

Πίνακας 2 : Συνολικές Βέλτιστες Συνθήκες Πειράματος

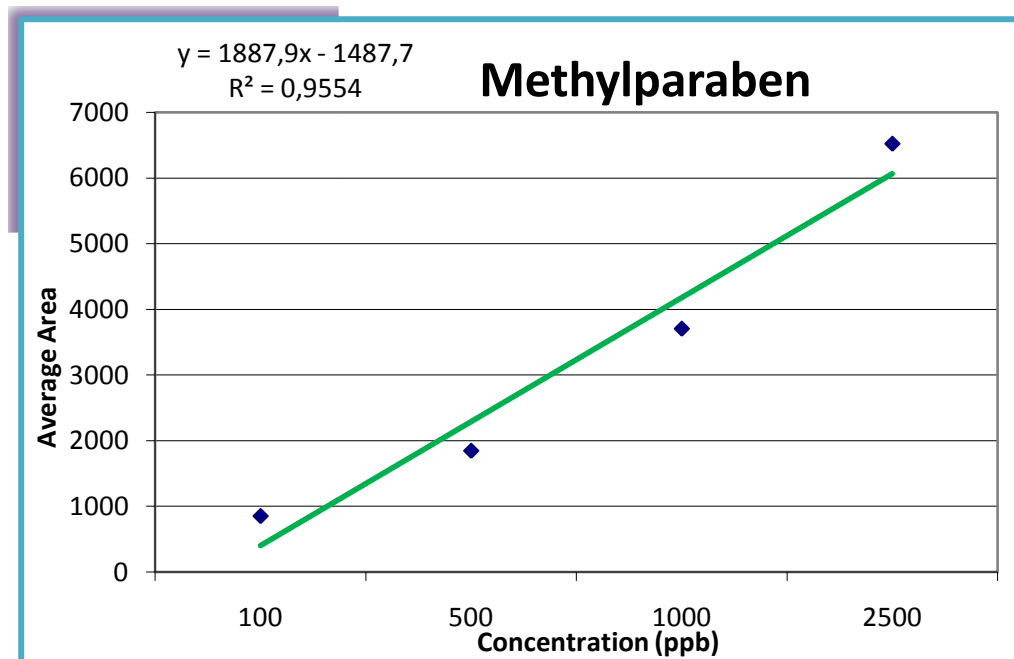
Παράμετρος	Βέλτιστη Τιμή
SLM	Οκτανόλη
Donor pH	5.5
Acceptor pH	5.5
Δυναμικό(Volt)	50
Χρόνος Ανάδευσης (min)	15
Ταχύτητα Ανάδευσης(rpm)	1000

9. Απόδοση της Μεθόδου - (Method Performance)

9.1 Γραμμικότητα (Linearity)

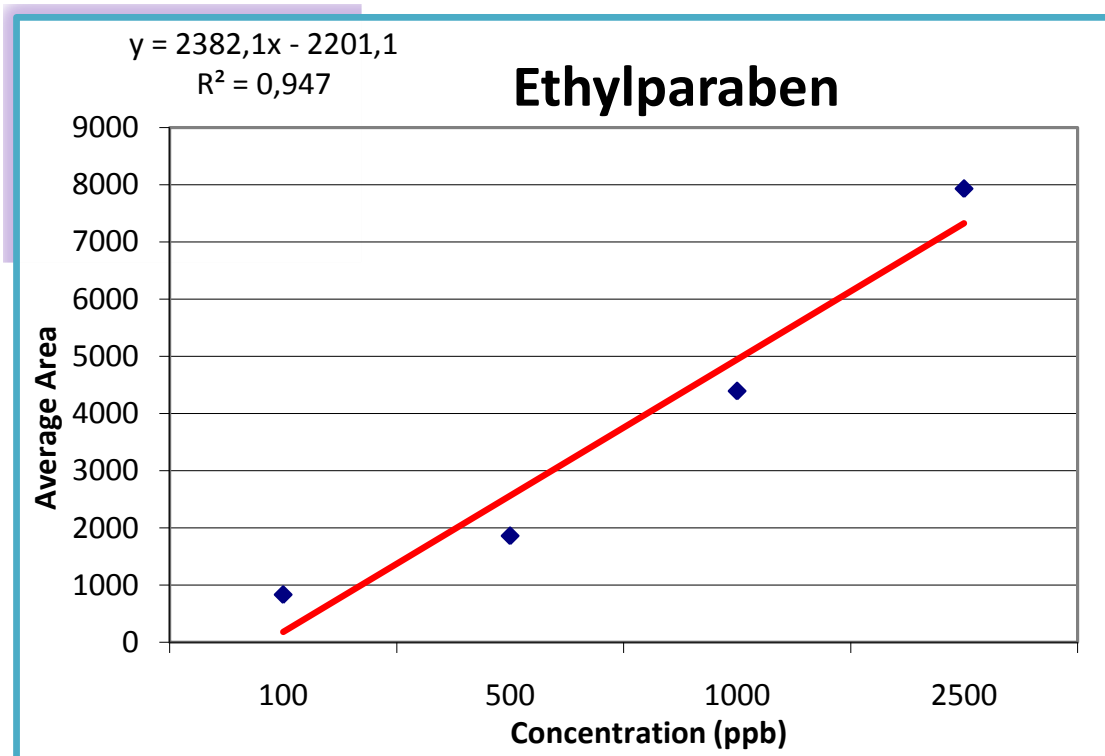
Στη συνέχεια μελετήθηκε η απόδοση της ΕΜΜΕ και οι εν λόγω ρύποι εκχυλίστηκαν υπό τις βέλτιστες συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Για τη διερεύνηση της γραμμικότητας της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συγκεντρώσεις των παραβενίων: 100, 500, 1000 και 2500 µg/L.

Για την ένωση του μέθυλ-παραβενίου η γραμμικότητα κρίνεται καλή με συντελεστή συσχέτισης ίσο με $r^2 = 0.9554$:



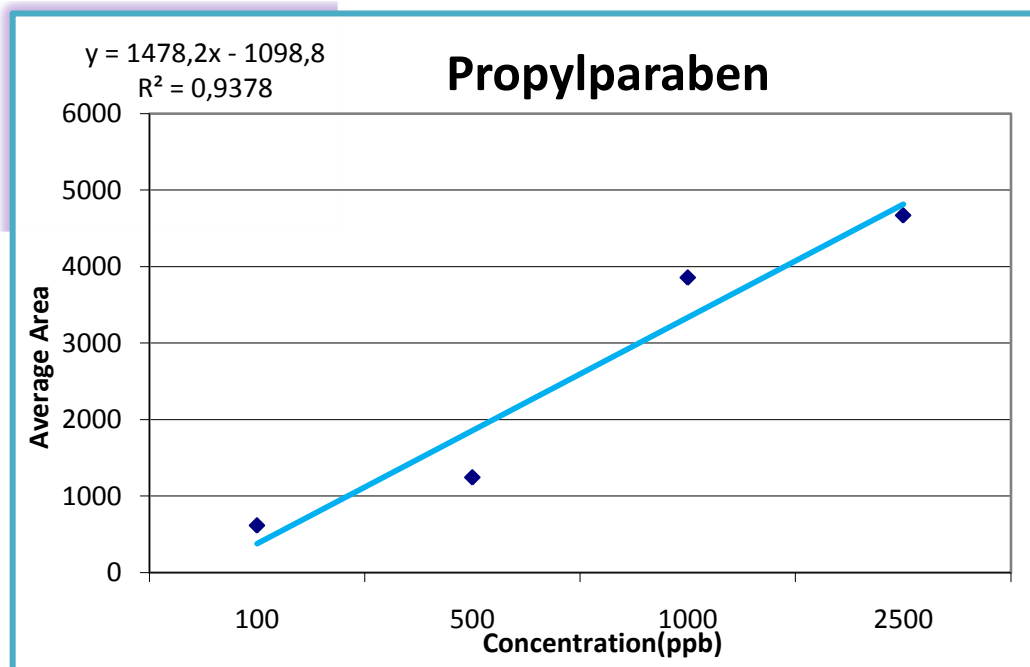
Διάγραμμα 7: Παρουσίαση Γραμμικότητας της μεθόδου ΕΜΜΕ για την ένωση του μέθυλ - παραβενίου

Για την ένωση του αιθυλ-παραβενίου η γραμμικότητα κρίνεται καλή με συντελεστή συσχέτισης ίσο με $r^2 = 0.947$:



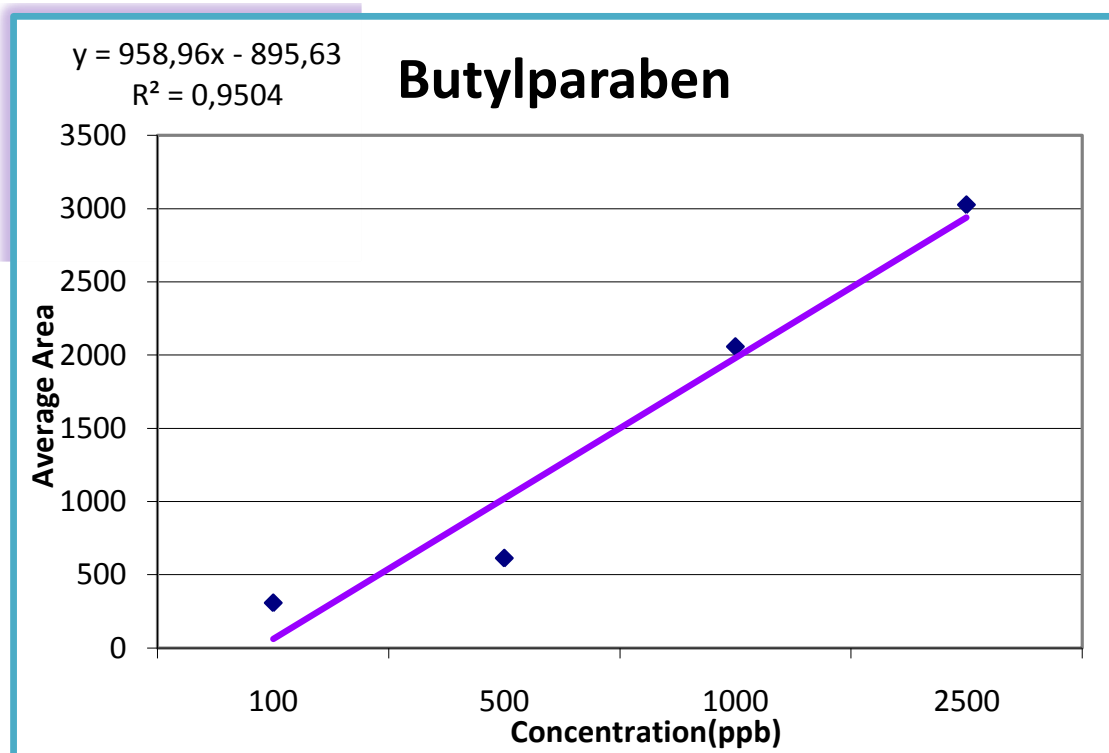
Διάγραμμα 8: Παρουσίαση Γραμμικότητας της μεθόδου ΕΜΜΕ για την ένωση του αιθυλ – παραβενίου

Για την ένωση του πρόπυλ-παραβενίου η γραμμικότητα κρίνεται πολύ καλή με συντελεστή συσχέτισης ίσο με $r^2 = 0.937$:



Διάγραμμα 9: Παρουσίαση Γραμμικότητας της μεθόδου ΕΜΜΕ για την ένωση του πρόπυλ - παραβενίου

Για την ένωση του βουτυλ-παραβενίου η γραμμικότητα κρίνεται άριστη με συντελεστή συσχέτισης ίσο με $r^2 = 0.95$:



Διάγραμμα 10: Παρουσίαση Γραμμικότητας της μεθόδου ΕΜΜΕ για την ένωση του βούτυλ – παραβενίου

Οι σχετικά χαμηλές τιμές γραμμικότητας για τα τέσσερα παραβένια οφείλονται στο ότι η μέθοδος περιλαμβάνει πολλές παραμέτρους προς έλεγχο, όπως είναι για παράδειγμα η ακριβής αναπαραγωγή μιας συγκεκριμένης απόστασης μεταξύ των ηλεκτροδίων, γεγονός που καθιστά την πειραματική διαδικασία δύσκολα επαναλήψιμη. Συχνό φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί είναι ότι η χρήση της οκτανόλης λειτουργεί ανασταλτικά μέχρι ένα βαθμό καθώς είναι εμπόδιο στην εκχύλιση των ενώσεων από τη δεύτερη διεπιφάνεια της οργανικής στην υδατική φάση του διαλύματος – δέκτη μειώνοντας έτσι τα ποσοστά ανάκτησης. Η παράμετρος αυτή μετρήθηκε παίρνοντας το διάλυμα – δέκτη και αναλύοντας το με τη μέθοδο HF – LPME που είχε βελτιστοποιηθεί στο εργαστήριο. Από τις μετρήσεις αυτές προέκυψε το συμπέρασμα ότι μεγάλο ποσοστό των ενώσεων έμενε στην οργανική φάση της οκτανόλης και δε μεταφερόταν στο υδατικό διάλυμα – δέκτη, γεγονός όμως που είναι αναμενόμενο από τη στιγμή που δεν υπάρχει διαφορά του pH μεταξύ δότη και δέκτη.

Παρατηρούνται λοιπόν, υψηλές τυπικές αποκλίσεις μεταξύ των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων με αποτέλεσμα τη μείωση της γραμμικότητας της μεθόδου, στοιχείο όμως που οφείλεται στην ιδιαιτερότητα της EMME ως μέθοδος εκχύλισης.

Τα όρια ανίχνευσης (LOD) των παραβενίων υπολογίστηκαν κάνοντας χρήση των καμπυλών βαθμονόμησης (γραμμικότητα) και κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων, της τάξης του 50 $\mu\text{g/L}$. Εκφράζονται ως το γινόμενο της τυπικής απόκλισης πολλαπλασιασμένο επί 3 και βρέθηκαν σε εύρος 2,76 έως 8,98 $\mu\text{g/mL}$.

9.2 Επαναληψιμότητα Μεθόδου (Repeatability)

Η επαναληψιμότητα ελέγχθηκε με βάση τις βέλτιστες συνθήκες σε έξι (6) ξεχωριστά δείγματα. Αναλυτικότερα: σε δείγματα 7 ml υπερκάθαρου νερού, με pH ίσο με 5.5, έγινε προσθήκη 50 µg/L παραβενίων, εμβάπτιση της σωληνοειδούς μεμβράνης στην οκτανόλη για 5 sec, εισαγωγή 25 µL υπερκάθαρου νερού ως διάλυμα - δέκτης στη μεμβράνη και τοποθέτησή της στο διάλυμα, εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού στα 50 Volt και ταυτόχρονη ανάδευση για χρονικό διάστημα 15 λεπτών στα 1000 rpm. Η σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation – RSD) για τη συγκέντρωση αυτή υπολογίστηκε όπως αναφέρεται ανωτέρω και βρέθηκε σε εύρος από 7,4 έως 9,9%.

Η τυπική απόκλιση (Standard Deviation) προκύπτει από το λόγο της τιμής (Area κάθε Δείγματος)/(Μέση Τιμή Δειγμάτων) ενώ η σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation – RSD) ορίζεται για μια σειρά μετρήσεων ίση με το λόγο της (τυπικής απόκλισης)/(μέση τιμή) και εκφράζεται επί τοις εκατό (RSD %).

Επίσης πραγματοποιήθηκε ακόμη μια σειρά μετρήσεων προς επαλήθευση της επαναληψιμότητας και πάλι σε σειρά έξι δειγμάτων (n=6).

Αυτή τη φορά σε δείγματα 7 ml υπερκάθαρου νερού με pH ίσο με 5.5, στα οποία έγινε προσθήκη 500 µg/L παραβενίων, εμβάπτιση της σωληνοειδούς μεμβράνης στην οκτανόλη για 10 sec, εισαγωγή 25 µL υπερκάθαρου νερού ως διάλυμα - δέκτης στη μεμβράνη και τοποθέτησή της στο διάλυμα, εφαρμοσθηκε ηλεκτρικό δυναμικό στα 50 Volt με ταυτόχρονη ανάδευση για χρονικό διάστημα 15 λεπτών στα 1000 rpm. Αντίστοιχα η τιμή της σχετικής τυπικής απόκλισης υπολογίστηκε και βρέθηκε σε εύρος από 9,6 έως 19,4%.

Στον πίνακα 3 φαίνονται συγκεντρωμένα τα αποτελέσματα.

Πίνακας 3: Επαναληψιμότητα

Concentration(ppb)	MP(%)	BP(%)	PP(%)	BP(%)
50	7,8	9,9	7,4	8,1
500	14,2	9,7	19,4	11,4

10. Εφαρμογή Βέλτιστων Συνθηκών σε Περιβαλλοντικά Δείγματα

Η αποτελεσματικότητα και εφαρμοσιμότητα της μεθόδου μικρό – εκχύλισης ηλεκτρομεμβράνης επηρεάζεται από τη σύνθεση της μήτρας του δείγματος. Συνεπώς δείγματα από την είσοδο αλλά και την έξοδο του βιολογικού καθαρισμού επιμολύνθηκαν με 200 µg/L και αναλύθηκαν υπό τις βέλτιστες συνθήκες της ΕΜΜΕ. Ο μέσος όρος των μετρήσεων ($n = 3$) για κάθε ένωση σε κάθε επιμολυσμένο δείγμα συγκρίθηκε ως προς το μέσο όρο των τιμών ($n = 3$) δείγματος υπερκάθαρου νερού της ίδιας επιμόλυνσης προκειμένου να υπολογιστεί η σχετική ανάκτηση για κάθε μήτρα.

Μετρήθηκε η διαφορά του ρυπασμένου δείγματος υπερκάθαρου νερού με το μη – ρυπασμένο δείγμα και αντίστοιχα η διαφορά του ρυπασμένου με το μη-ρυπασμένο δείγμα της κάθε μήτρας. Η ανάκτηση της κάθε μήτρας προέκυψε από το λόγο της (διαφοράς συγκέντρωσης των δειγμάτων της κάθε μήτρας) / (τη διαφορά συγκέντρωσης δειγμάτων του υπερκάθαρου νερού).

Όπως φαίνεται και από τον παρακάτω πίνακα, η αποτελεσματικότητα της προτεινόμενης μεθόδου για τα δείγματα εισόδου και εξόδου κρίθηκε ικανοποιητική όπως φαίνεται και από τα ποσοστά της ανάκτησης.

Πίνακας 4 : Ανάκτηση Παραβενίων από δείγματα διηθημένης εξόδου βιολογικού καθαρισμού.

Διηθημένη Έξοδος	
	Ανάκτηση (%)
Methylparaben	89,3
Ethylparaben	85,6
Propylparaben	74,7
Butylparaben	88,8

Ανάλυση Αληθινών Δειγμάτων

Παράλληλα στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση παραβενίων και ανάλυση αληθινών δειγμάτων αδιήθητης εισόδου βιολογικού καθαρισμού των Χανίων χωρίς να γίνει επιμόλυνση. Στο δείγμα ανιχνεύθηκαν οι εν λόγω ρύποι σε συγκέντρωση (συγκρινόμενη με τη γραμμικότητα) ίση με 200 µg/L, γεγονός που αποδεικνύει ότι η μέθοδος ενδείκνυται για δύσκολες μήτρες.

Θα έπρεπε να αναφερθεί ότι έγινε προσπάθεια εκχύλισης παραβενίων και από πόσιμο νερό βρύσης το οποίο προμηθευτήκαμε από βρύση του εργαστηρίου, όμως εξαιτίας της χλωρίωσης που υφίσταται το νερό βρύσης η μικρο – εκχύλιση δεν ήταν εφικτή. Η προσπάθεια εκχύλισης τους από νερό βρύσης πραγματοποιήθηκε και με βελτιστοποιημένη μέθοδο HF – LPME στο εργαστήριο αλλά και πάλι εξαιτίας της χλωρίωσης του νερού δεν έγινε εφικτή. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η παρουσία υψηλών ποσοστών χλωρίωσης στο νερό εξουδετερώνει τους εν λόγω ρύπους ενώ έχουν γίνει και αναφορές σχετικά με τη δημιουργία στρώματος υδροχλωρικού οξέος που εμποδίζει τις ενώσεις να μεταφερθούν από και προς την οργανική φάση της SLM^[34].

Συμπληρωματικά υπολογίστηκαν και οι συντελεστές εμπλουτισμού οι οποίοι κυμάνθηκαν από 0,77 έως 1,01, δηλαδή ήταν πολύ χαμηλοί, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η προτεινόμενη μέθοδος EMME είναι κατάλληλη για επιβαρυσμένες και ρυπασμένες περιβαλλοντικές μήτρες.

11. Συμπεράσματα

Η παρούσα εργασία παρουσιάζει για πρώτη φορά τη δυνατότητα μικρό – εκχύλισης παραβενίων μέσω μιας λεπτής κοιλώδους μεμβράνης SLM με την ταυτόχρονη εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού. Η προτεινόμενη μέθοδος εφαρμόζεται πρώτη φορά ύστερα από συνεργασία με ομάδα Νορβηγών επιστημόνων και διδαχή των βασικών αρχών της μικρο - εκχύλισης ηλεκτρομεμβράνης. Η εκχύλιση των παραβενίων ποίκιλε ανάλογα με ορισμένες παραμέτρους οι οποίες και εξετάστηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας ενώ εξετάστηκε και η επαναληψιμότητα και γραμμικότητα της μεθόδου.

Σημαντικό κριτήριο για τη μέθοδο της μικρό – εκχύλισης ηλεκτρομεμβράνης ήταν η επιλογή της «υγρής υποστηριζόμενης μεμβράνης» SLM όπου δοκιμάστηκαν διάφοροι διαλύτες με τελική επιλογή αυτή της οκτανόλης, ως η πλέον κατάλληλη. Η διαδικασία βελτιστοποιήθηκε περαιτέρω με την επιλογή του pH για το διάλυμα – δότη αλλά και για το διάλυμα – δέκτη, την επιλογή του ηλεκτρικού δυναμικού, του χρόνου ανάδευσης και της ταχύτητας ανάδευσης.

Με ισχυρή ανάδευση της τάξης των 1000 rpm και σε χρονικό διάστημα μόλις 15 λεπτών επετεύχθησαν υψηλές τιμές ανάκτησης των παραβενίων υποδεικνύοντας ότι η μέθοδος της EMME εκτός από καινοτόμος είναι ταχεία και αποτελεσματική όσον αφορά τη μικρό – εκχύλιση. Επιπρόσθετα, οι χαμηλές τιμές του ποσοστού εμπλουτισμού (Enrichment Factor, EF) αποδεικνύουν ότι η μέθοδος ενδείκνυται και λειτουργεί σε δύσκολες μήτρες όπως η είσοδος και η έξοδος βιολογικού καθαρισμού, είναι δηλαδή πολλά υποσχόμενη για την ανάλυση πολύπλοκων περιβαλλοντικών δειγμάτων.

Επίσης η προετοιμασία των δειγμάτων είναι πολύ γρήγορη ενώ η χρήση οργανικών διαλυτών πολύ περιορισμένη αφού δε χρειάζονται παραπάνω από 15 μL για τη δημιουργία της SLM. Ταυτόχρονα η χρήση των εξαρτημάτων είναι μονή για κάθε πείραμα γεγονός που δεν επιτρέπει την επιμόλυνση χωρίς να υπάρχει ενδεχόμενο υψηλού κόστους.

Παρόλα τα πλεονεκτήματα της όμως η μέθοδος έχει περιθώρια βελτίωσης καθώς υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που μειώνουν την απόδοση της. Ένας από αυτούς είναι η εύρεση πιθανού συνδυασμού διαλυτών για την εκχύλιση των εν λόγω ενώσεων, καθώς μπορεί να χρειάζεται συνδυασμός διαλυτών για τη βέλτιστη απόδοση της εκχύλισης, γεγονός που αυξάνει το βαθμό δυσκολίας και επιτυχίας της μεθόδου ώστε οι διαλύτες να μη λειτουργούν ως φραγμός στη μεταφορά στο διάλυμα – δέκτη.

Ακόμη η αρχική μέθοδος που διδάχτηκε από την νορβηγική ομάδα διέφερε στο πολύ σημαντικό σημείο του όγκου του διαλύματος δότη, καθώς στη μέθοδο EME χρησιμοποιούν διάλυμα όγκου το πολύ ως 3 mL. Στην μέθοδο EMMΕ που αναπτύχθηκε όμως ήταν απαραίτητος ο όγκος των 7 mL έτσι ώστε να είναι αρκετή η ποσότητα του διαλύματος δέκτη ώστε να μπορεί να αναλυθεί με το μηχάνημα HPLC –DAD. Η σημασία της διαφορά του όγκου διαλύματος έγκειται αφενός στην μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων αλλά και αφετέρου στη μεγάλη απόσταση μεταξύ της μεμβράνης SLM και του πάτου του φυαλιδίου, στοιχεία που δυσχεραίνουν τη δυνατότητα μικρό – εκχύλισης.

Επίσης, είναι ιδιαίτερα μεγάλη πρόκληση για το χρήστη να καταφέρει να ελέγξει την απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων κατά την τοποθέτησή τους στο φιαλίδιο και την μεμβράνη κατά την πειραματική διαδικασία. Η απόσταση παίζει σημαντικό ρόλο καθώς δεν πρέπει να είναι μεγάλη γιατί δε θα είναι δυνατή η μεταφορά των ενώσεων αλλά ούτε και να ακουμπούν μεταξύ τους εξουδετερώνοντας το ηλεκτρικό δυναμικό. Συμπληρωματικά, η όλη διάταξη για τη διεκπεραίωση του πειράματος είναι εντελώς ερασιτεχνική και κατασκευάστηκε στο εργαστήριο, γεγονός που δεν επιτρέπει αυτοματισμούς και κατά συνέπεια ευκολία στις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Εξαιτίας όλων των παραπάνω η μέθοδος μικρό – εκχύλισης ηλεκτρομεμβράνης χαρακτηρίζεται από σχετικά υψηλές τιμές τυπικών αποκλίσεων γεγονός που δεν επιτρέπει καλύτερες τιμές γραμμικότητας, κοντινότερες στη μονάδα.

Η μέθοδος μικρό - εκχύλισης που αναλύεται περιλαμβάνοντας τη θεμελιώδη και ουσιώδη συζήτηση διασφαλίζει ένα σημείο εκκίνησης για

μελλοντικά πειράματα και σε άλλες μήτρες ή άλλου τύπου ενώσεις ενώ ειδικεύεται σε δύσκολες και πιο μολυσμένες μήτρες. Αυτό συμβαίνει διότι η μέθοδος είναι ευέλικτη όσον αφορά την κινητήρια δύναμη του ηλεκτρισμού που ελέγχεται απλά εναλλάσσοντας την πολικότητα των ηλεκτροδίων ή με ένα διακόπτη αλλά και διότι η εκχύλιση ενώσεων μπορεί να εξαρτηθεί και από τις χημικές ιδιότητες της μεμβράνης.

12. Μελλοντικές Κατευθύνσεις

Η μικροεκχύλιση μέσω ηλεκτρομεμβράνης ΕΜΜΕ, ιδιαίτερα στα πλαίσια της αναλυτικής χημείας, αποτελεί μια ενδιαφέρουσα μελλοντική κατεύθυνση για προσυγκέντρωση των ρύπων. Αυτό οφείλεται στην υψηλή ταχύτητα και επιλεκτικότητα της μεθόδου αν και η γενικότερη γνώση για τη μεταφορά ρύπων αυτού του τύπου παραμένει ακόμη περιορισμένη. Έτσι περαιτέρω διερεύνηση της κινητικής των ενώσεων μέσω της μεμβράνης κρίνεται απαραίτητη για ουσιαστική κατανόηση, βελτιστοποίηση και απόδοση της μεθοδολογίας με την οποία εκχυλίζονται οι ρύποι μέσα στο διάλυμα – δέκτη.

Επίσης όπως εξηγήθηκε ανωτέρω η μέθοδος χαρακτηρίζεται από αρκετά μεγάλες τυπικές αποκλίσεις και μειωμένη γραμμικότητα, όμως διαθέτει το πλεονέκτημα της δυνατότητας μικρο – εκχύλισης των παραβενίων από δύσκολες και περίπλοκες περιβαλλοντικές μήτρες.

Είναι επομένως θεμιτό να συνεχιστεί η πειραματική έρευνα στον τομέα αυτό προκειμένου να βελτιωθεί η μέθοδος, να προκύψουν μικρότερες τυπικές αποκλίσεις και καλύτερες τιμές γραμμικότητας.

Βιβλιογραφία

- [1] Optimization of some experimental parameters in the electro membrane extraction of chlorophenols from seawater , Jingyi Lee, Faezeh Khalilian, Habib Bagheri, Hian Kee Lee
- [2] Developments in single drop microextraction , E.Psillakis, N.Kalogerakis, Trends in analytical chemistry, Vol 21, no.1, 2002
- [3] Διπλωματική εργασία «Προσδιορισμός PFOS με χρήση υγρής μικροεκχύλισης συζευγμένης με LC/MS» , Πολυτεχνείου Κρήτης , Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Παπαδοπούλου Αικατερίνης, 2008
- [4] Hollow fiber liquid phase microextraction of parabens, Aleksandra Prichodko, Kristina Jonusaite, Vida Vickackaite, Central European Journal of Chemistry 7(3), 2009, 285-290
- [5] Analysis of quantification of parabens in cosmetic products by utilizing hollow fibre-supported liquid membrane and high performance liquid chromatography with ultra violet detection, T.A.M .Msagati, T. Barri, N.Larsson, J. A. Johnsson
- [6] Electromembrane extraction of peptides, Marte Balchen, Leon Reubsaet, Stig Pedersen – Bjergaard
- [7] <http://en.wikipedia.org/wiki/Paraben>
- [8] [www. Google.com](http://www.google.com)
- [9] http://www.google.gr/#hl=el&source=hp&q=what+are+parabens&aq=f&aqi=&aql=&oq=&gs_rfai=&fp=8d2bddb2a675e28c
- [10] Determination of chlorinated by-products of parabens in swimming pool water, Masanori Terasaki and Masakazu Makino, Intern. J. Environ. Anal. Chem. Vol 88, 911-922

- [11] H-B Lee, T.E. Peart, and M.L. Svoboda, J. Chromatogr. A. 1094, 122 (2005)
- [12] Formation of halogenated by-products of parabens in chlorinated water, P.Canosa, I. Rodriguez, E. Rubi, N. Negreira, R. Cela, Analytica Chimica Acta, 575 (2006) 106- 113
- [13] Significance of the detection of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens) in human breast tumors, J. of Applied Toxicology : JAT (24) (1) : 1-4
- [14] <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn++99-76-3>
- [15] Construction of simplified models to simulate estrogenic disruptions by esters of 4-hydroxy benzoic acid (parabens), Patricia Guadarrama, Serguei Fomine, Roberto Salcedo, Ana Martínez, Biophysical Chemistry 137 (2008) 1–6
- [16] <http://www.fda.gov/Cosmetics/ProductandIngredientSafety/SelectedCosmeticIngredients/ucm128042.htm>
- [17] <http://www.cameochemicals.noaa.gov/chemical/19932>
- [18] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=7456>
- [19] The effects of parabens on the mechanosensitive channels of E. coli, Thom Nguyen Z Brian Clare Z Wei Guo Z Boris Martinac, Eur Biophys J (2005) 34: 389–395
- [20] <http://www.chem.uoa.gr/vocabulary/Vocabularylist.asp>
- [21] <http://www.wisegeek.com/what-is-propylparaben.htm>
- [22] Acute toxicity of parabens and their chlorinated by-products with Daphnia magna and Vibrio fischeri bioassays, Masanori Terasaki, Masakazu Makino and Norihisa Tatarazako, J.of Applied Toxicology,2009;29: 242-247
- [23] Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review, Analytica Chimica Acta 624(2008) 253–268

- Jingyi Lee, Hian Kee Lee, Knut E. Rasmussen, Stig Pedersen-Bjergaard
- [24] P.D Darbe, P.W. Harvey, J. Appl. Toxicol. 28, 561 (2008)
- [25] Simulation of flux during electro-membrane extraction based on the Nernst–Planck equation, Astrid Gjelstad, Knut Einar Rasmussen, Stig Pedersen-Bjergaard
- [26] Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature, M.G. Soni, S.L. Taylor, N.A. Greenberg, G.A. Burdock, Food and Chemical Toxicology 40 (2002) 1335–1373
- [27] Low – voltage electromembrane extraction of basic drugs from biological samples. J. of Chromatography A, 1180(2008) 1-9
- [28] Photodegradation of butylparaben in aqueous solutions by 254 nm irradiation, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 203 (2009) 131–136
- [29] Photocatalytic degradation of methylparaben by TiO₂: Multivariable experimental design and mechanism, Applied Catalysis B: Environmental 88 (2009) 32–41
- [30] Parameters affecting electromembrane extraction of basic drugs, J.Sep.Sci.2008,31, 753-759
- [31] Electromembrane extraction of basic drugs from untreated human plasma and whole blood under physiological pH conditions, Anal. Bioanal.Chem (2009) 393:921-928
- [32] Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction, Trends in Analytical Chemistry, Vol 23, No 1, 2004
- [33] Electrokinetic migration of acidic drugs across a supported liquid membrane, J. of Chromatography A, 1152 (2007) 220-225
- [34] Electrokinetic migration across artificial liquid membranes, New concept for rapid sample preparation of biological fluids, Stig Petersen – Bjergaard, Knut Einar Rasmussen, Journal of Chromatography A, 1109 (2006) 183-190
- [35] Microextraction across supported liquid membranes forced by pH gradients and electrical fields, Astrid Gjelstad, Torill Marita Andersen, Knut Einar Rasmussen, Stig Petersen – Bjergaard, Journal of Chromatography A, 1157 (2007) 38-45