



Εργαστήριο Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης

ΑΣΚΗΣΗ 3

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΟΚΤΑΝΟΛΗΣ/ΝΕΡΟΥ (K_{ow}) ΜΕ HPLC

Σκοπός της άσκησης

Σκοπός της άσκησης είναι ο άμεσος πειραματικός προσδιορισμός του συντελεστή κατανομής οκτανόλης/νερού (K_{ow}) με τη χρήση HPLC.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Χρωματογραφία

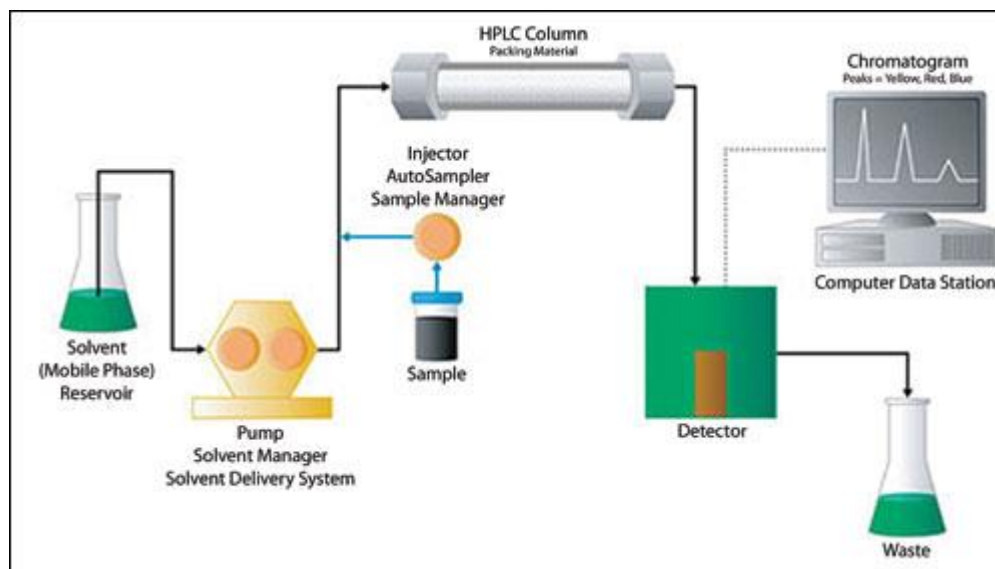
Η χρωματογραφία είναι μια από τις σημαντικότερες τεχνικές διαχωρισμού και μέθοδος ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης, που βρίσκει εφαρμογές σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους. Ο διαχωρισμός στηρίζεται στις διαφορετικές κατανομές των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ δυο φάσεων. Η μία παραμένει σταθερή και ονομάζεται *στατική φάση* και η άλλη διέρχεται διαμέσου της στατικής φάσης και ονομάζεται *κινητή φάση*. Όταν η κινητή φάση είναι κάποιο υγρό (διαλύτης) αναφερόμαστε στην υγρή χρωματογραφία.

Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (ή Απόδοσης) [High Pressure (Performance) Liquid Chromatography, HPLC]

Η HPLC είναι χρωματογραφική μέθοδος που αποτελεί εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας. Αναπτύχθηκε μέσα από τις συνεχείς προσπάθειες βελτίωσης της απλής χρωματογραφίας στήλης και χρησιμοποιεί μεγάλες πιέσεις (μέχρι και 100 MPa=1000 bar), οι οποίες είναι απαραίτητες, καθώς γίνεται χρήση μικρόκοκκων υλικών πλήρωσης (σύνθετες μέγεθος σωματιδίων 3-5μm). Επιτυγχάνονται έτσι καλύτεροι και ταχύτεροι διαχωρισμοί μιγμάτων.

Οργανολογία HPLC

Ένα σύστημα HPLC αποτελείται από τα παρακάτω τμήματα, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.1:



Σχήμα 3.1: Τυπική διάταξη υγρού χρωματογράφου υψηλής πίεσης.

- 1) Φιάλη (ες) αποθήκευσης διαλυτών.
- 2) Αντλία (υψηλής πίεσης).
- 3) Μονάδα εισαγωγής δείγματος (ειδική βαλβίδα).
- 4) Χρωματογραφική στήλη.
- 5) Ανιχνευτή.
- 6) Σύστημα καταγραφής και αποθήκευσης των αποτελεσμάτων.
- 7) Δοχείο συλλογής αποβλήτων.

Η προώθηση του διαλύτη (κινητή φάση) διαμέσου του υλικού πλήρωσης της στήλης (στατική φάση) επιτυγχάνεται με τη χρήση αντλίας υψηλής πίεσης. Στη χρωματογραφική στήλη λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος. Πολλά συστήματα περιλαμβάνουν κι έναν φούρνο για τον έλεγχο της θερμοκρασίας της στήλης. Η διεργασία του χρωματογραφικού διαχωρισμού αρχίζει με την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη με τη βοήθεια ειδικής βαλβίδας. Κάθε ένα από τα συστατικά του δείγματος εκλούεται και εμφανίζεται ως κορυφή στο σύστημα καταγραφής. Η ανίχνευση των εκλουόμενων συστατικών αποτελεί μια πολύ σημαντική παράμετρο και μπορεί να είναι είτε εκλεκτική είτε όχι, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο ανιχνευτή. Η απόκριση του ανιχνευτή για κάθε ένα από τα συστατικά του δείγματος είτε καταγράφεται σε χαρτί, είτε απεικονίζεται στην οθόνη του υπολογιστή και αποτελεί το χρωματογράφημα του διαχωρισμού, ενώ η αποθήκευση των αναλυτικών δεδομένων γίνεται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η ταυτοποίηση των ουσιών γίνεται με βάση το χρόνο συγκράτησης, ο οποίος είναι σταθερός για ορισμένο χρωματογραφικό σύστημα (αναλυτική στήλη, κινητή φάση,

ταχύτητα ροής, πίεση), ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με βάση την καμπύλη αναφοράς εφαρμόζοντας συνήθως την τεχνική του εσωτερικού προτύπου.

Συντελεστής κατανομής K_{ow}

Ο λιποφιλικός ή όχι χαρακτήρας μίας ένωσης μας παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την περιβαλλοντική της συμπεριφορά. Για παράδειγμα μας δίνει πληροφορίες για την πιθανότητα ενσωμάτωσης ή πρόσληψης από οργανισμούς, προσρόφησης σε στερεά που περιέχουν οργανική ύλη κλπ. Ο λιποφιλικός χαρακτήρας μίας ένωσης μπορεί να προσεγγιστεί μέσω της τάσης της ένωσης Α να κατανέμεται μεταξύ οκτανόλης και νερού.

Ως συντελεστής κατανομής K_{ow} μιας ένωσης Α ορίζεται ο λόγος της συγκέντρωσης της Α στην οκτανόλη (C_{oct}) προς τη συγκέντρωση της Α στο νερό (C_w) σε

κατάσταση ισορροπίας: $K_{ow} = C_{oct} / C_w$

Ο συντελεστής K_{ow} είναι μια παράμετρος κλειδί στις μελέτες για την τύχη οργανικών ενώσεων στο περιβάλλον. Μιας και η τιμή K_{ow} αντιπροσωπεύει την τάση μιας ένωσης να κατανέμεται μεταξύ μιας οργανικής (π.χ. ψάρια, χώμα) και της υδατικής φάσης, συσχετίζεται άμεσα με τη διαλυτότητα στο νερό, τους συντελεστές προσρόφησης σε χώμα και τους βαθμούς βιοσυσσώρευσης χημικών ενώσεων σε οργανισμούς.

Η τιμή του K_{ow} είναι χαρακτηριστική της τάσης που έχει μια οργανική ένωση να διαλυθεί στην υδατική ή στην οργανική φάση. Σε γενικές γραμμές για τιμές K_{ow} μικρότερες του 10 οι ενώσεις είναι σχετικά υδρόφιλες, ενώ για τιμές μεγαλύτερες του 10^4 οι ενώσεις είναι πολύ υδρόφοβες. Οι τιμές του K_{ow} των οργανικών ενώσεων κυμαίνονται μεταξύ 10^{-3} έως 10^7 ($\log K_{ow}$ από -3 έως 7).

Θα πρέπει να γίνει η επισήμανση ότι η τιμή του K_{ow} δεν ισούται με την διαλυτότητα της Α στην οκτανόλη προς την διαλυτότητα στο νερό, γιατί στο σύστημα οκτανόλης /νερό σε ισορροπία η οκτανόλη περιέχει 2,3 mol/l νερό και το νερό περιέχει $4,5 \cdot 10^{-3}$ mol/l οκτανόλη.

Ο συντελεστής K_{ow} μπορεί να προσδιοριστεί είτε πειραματικά, προσδιορίζοντας τις συγκεντρώσεις της ένωσης Α στην οκτανόλη και στο νερό, είτε με υπολογιστικές μεθόδους. Η μέθοδος των Meylan και Howard και η μέθοδος των Hansch και Leo είναι οι δύο βασικότερες υπολογιστικές μέθοδοι που επιτρέπουν την εκτίμηση του συντελεστή K_{ow} των διαφόρων οργανικών ενώσεων αποκλειστικά και μόνο μέσω της μοριακής δομής τους. Βασική ιδέα και για τις δύο μεθόδους είναι ότι οι διάφορες δομικές ομάδες/τμήματα έχουν συγκεκριμένη συνεισφορά στη τιμή του K_{ow} . Επομένως λαμβάνοντας υπόψη τις

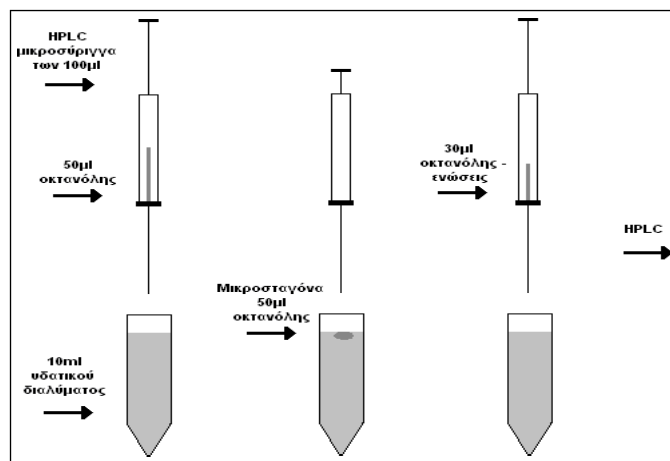
δομικές ομάδες από τις οποίες αποτελείται μια οργανική ένωση και αθροίζοντας τις συνεισφορές των δομικών ομάδων, είναι εφικτός ο προσδιορισμός του K_{ow} της ένωσης.

Ωστόσο, με αυτή την προσέγγιση δεν λαμβάνονται υπόψη τα στερικά φαινόμενα που πιθανώς δημιουργούνται μεταξύ των δομικών ομάδων (καθώς και άλλες ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις) και γι' αυτό το λόγο είναι συγχρόνως απαραίτητη η χρήση ενός μεγάλου αριθμού διορθωτικών παραγόντων που επιτρέπουν την διόρθωση των υπολογιζόμενων τιμών K_{ow} .

Μέθοδος Υγρής-Υγρής Μικροεκχύλισης

Ο άμεσος πειραματικός προσδιορισμός συντελεστή κατανομής οκτανόλης/νερού θα επιτευχθεί με χρήση της μεθόδου Υγρής-Υγρής Μικροεκχύλισης, που αποτελεί ουσιαστικά μικρογραφία της κλασσικής μεθόδου προετοιμασίας δειγμάτων «Υγρή-Υγρή Εκχύλιση». Αυτό επιτυγχάνεται με τη σημαντική μείωση του λόγου των όγκων της οργανικής και της υδατικής φάσης. Η οργανική φάση στην παρούσα περίπτωση είναι η οκτανόλη, η οποία είναι ένας μη υδατοδιαλυτός διαλύτης. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή η ουσία κατανέμεται μεταξύ της υδατικής και της οργανική φάσης ως εξής: μία μικροσταγόνα (50 μ L) οκτανόλης εισάγεται σε υδατικό διάλυμα συγκεκριμένου όγκου (10 mL) που περιέχει γνωστή ποσότητα της υπό εξέταση ένωσης (Σχήμα 3.2). Το φιαλίδιο αναδεύεται με τη βοήθεια συσκευής vortex, με αποτέλεσμα η μικροσταγόνα οργανικού διαλύτη να διασπαστεί πλήρως αυξάνοντας έτσι την συνολική διεπιφάνεια οκτανόλης/νερού και κάνοντας εφικτή την ταχύτερη επίτευξη συνθηκών ισορροπίας κατανομής της ένωσης μεταξύ των δυο φάσεων.

Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρείται ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις και να επανασηματιστεί η οργανική μικροσταγόνα. Με τη χρήση μιας μικροσύριγγας η μικροσταγόνα αποσπάται από το υδατικό διάλυμα και εισάγεται σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Η μέθοδος αυτή είναι γρήγορη και απλή, με μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία. Το βασικό πλεονέκτημα της είναι ότι η ισορροπία αποκαθίσταται εντός μερικών λεπτών, μειώνοντας έτσι το συνολικό χρόνο προσδιορισμού του συντελεστή κατανομής οκτανόλης/νερού.



Σχήμα 3.2: Μέθοδος Υγρής-Υγρής Μικροεκχύλισης

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Απαιτούμενα σκεύη/όργανα

- ☐ Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες με κωνικό πυθμένα
- ☐ Μικροσύριγγα των 100μl
- ☐ Συσκευή vortex
- ☐ Φυγόκεντρος

Αντιδραστήρια

- ☐ Ναφθαλένιο (Μοριακό Βάρος 128 g/mol)
- ☐ Dichlorvos (Μοριακό Βάρος 221 g/mol)
- ☐ Simazine (Μοριακό Βάρος 201,7 g/mol)
- ☐ Hydroquinone (Μοριακό βάρος 110,1 g/mol)
- ☐ 2.6-δichλωροφαινόλη (Μοριακό Βάρος 163 g/mol)
- ☐ 2.4-δichλωροφαινόλη (Μοριακό βάρος 163 g/mol)
- ☐ 2.4.6-τριχλωροφαινόλη (Μοριακό βάρος 197,5 g/mol)
- ☐ Φενανθρένιο (Μοριακό βάρος 178,2 g/mol)
- ☐ Φλουορανθένιο (Μοριακό βάρος 202,3 g/mol)
- ☐ Φλουορένιο (Μοριακό βάρος 166,2 g/mol)
- ☐ Μεθανόλη για Υγρή Χρωματογραφία

Στα πειράματα προσδιορισμού K_{ow} χρησιμοποιείται νερό κορεσμένο σε οκτανόλη και οκτανόλη κορεσμένη σε νερό. Αυτό επιτυγχάνεται αναμιγνύοντας ποσότητες οκτανόλης και απιονισμένου νερού για 10 λεπτά σε φιάλη διαχωρισμού και αφήνοντας το μίγμα σε κατάσταση ηρεμίας για 24 ώρες ώστε να διαχωριστούν οι δυο φάσεις.

Προετοιμασία δειγμάτων για εκχύλιση

Όγκος 10mL νερού (κορεσμένου σε οκτανόλη), που περιέχει γνωστή συγκέντρωση της προς εξέταση ένωσης, τοποθετείται σε φυγοκεντρικό φιαλίδιο και έπειτα ακολουθεί η προσθήκη 50μL οκτανόλης. Το μίγμα αναδεύεται με τη βοήθεια vortex για 2min σε 2500rpm, και έπειτα φυγοκεντρείται για 2min σε 3500rpm. Τέλος, συλλέγονται 30μL από την οκτανολική φάση που βρίσκεται στην επιφάνεια του δείγματος, τα οποία και εισάγονται για ανάλυση στην HPLC.

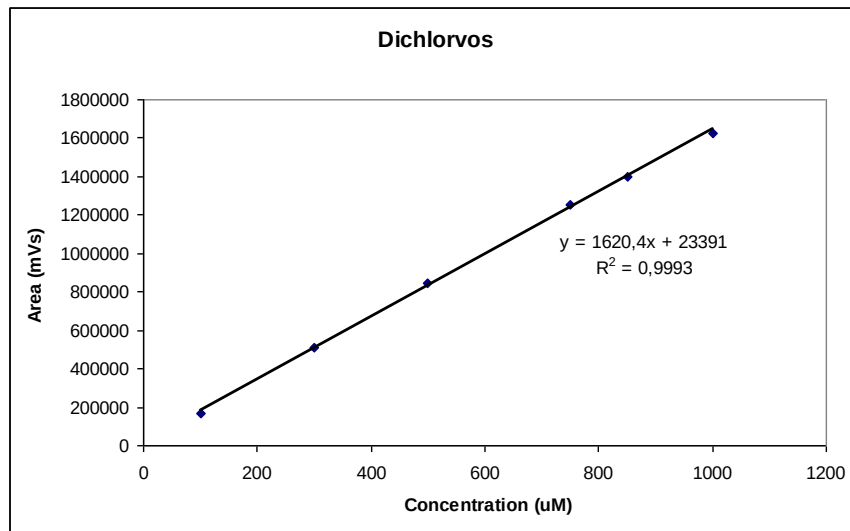
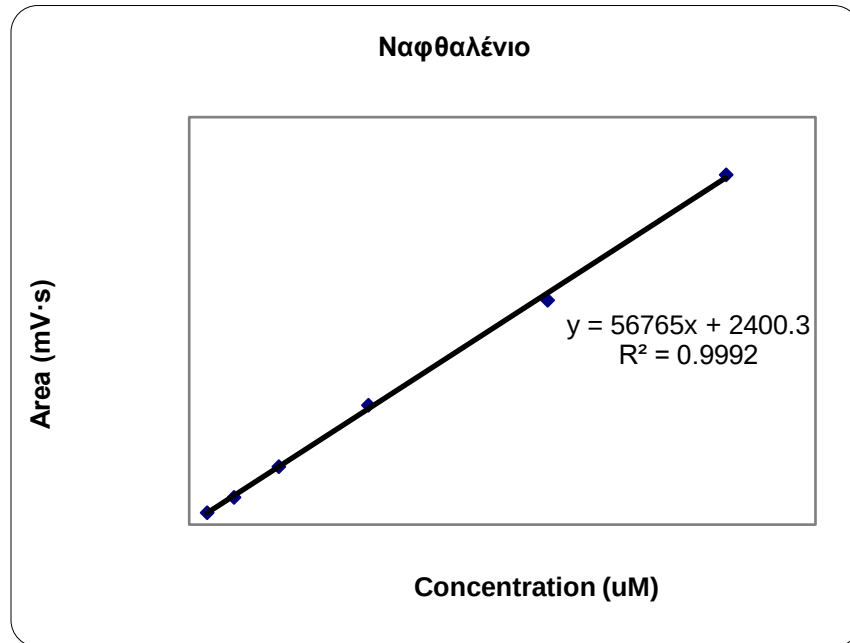
Αναλύσεις με HPLC

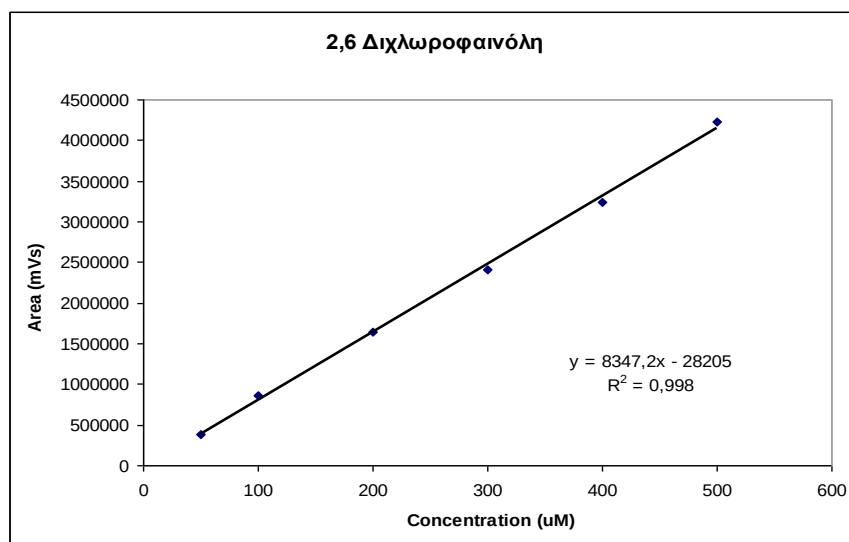
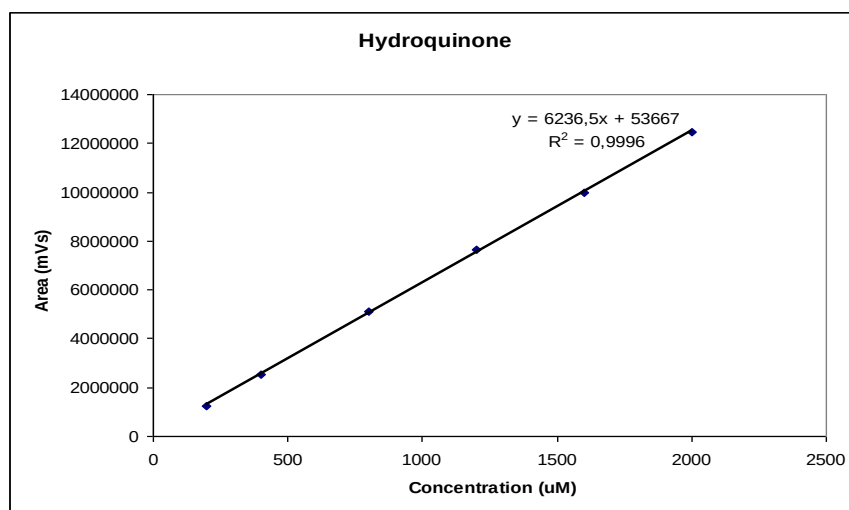
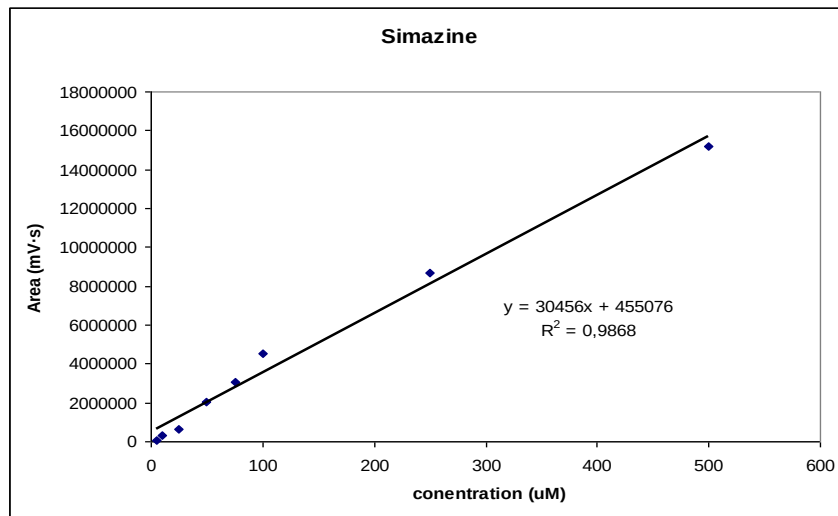
Για την ανάλυση των ενώσεων θα χρησιμοποιηθεί σύστημα HPLC της Shimadzu με χρωματογραφική στήλη Zorbex Eclipse XDB – C₁₈ Analytical 4.6 x 150mm 5-Micron (Agilent). Η κινητή φάση αποτελείται από μίγμα σε αναλογία 85:15 μεθανόλη:νερό. Ο όγκος του προς ανάλυση δείγματος είναι 30 μL και η ανίχνευση πραγματοποιείται με ανιχνευτή υπεριώδους (UV) σε μήκος κύματος 220-250 nm (ρυθμίζεται στο μήκος κύματος που παρουσιάζει η κάθε ένωση τη μέγιστη απορρόφηση). Η θερμοκρασία του φούρνου είναι 27 °C, ο χρόνος ανάλυσης 5-7min (ανάλογα με την ένωση) και η ροή είχε οριστεί στα 0.8 mL/min.

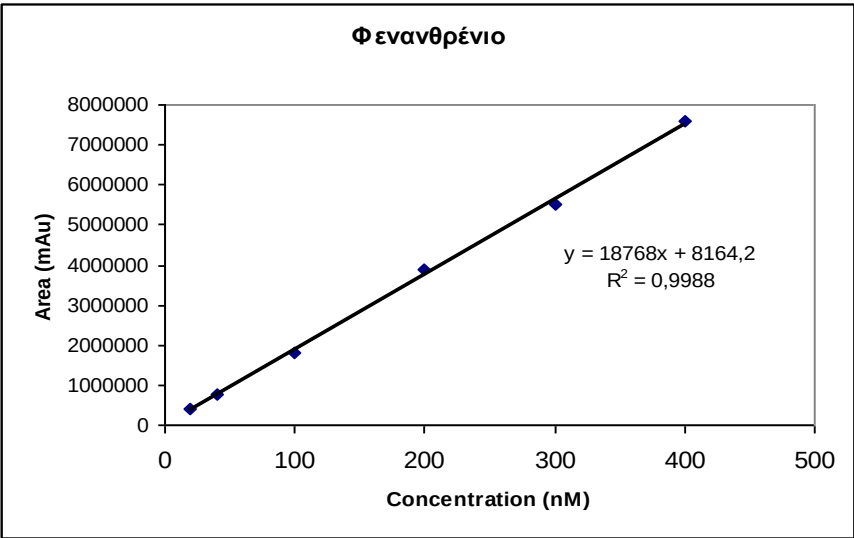
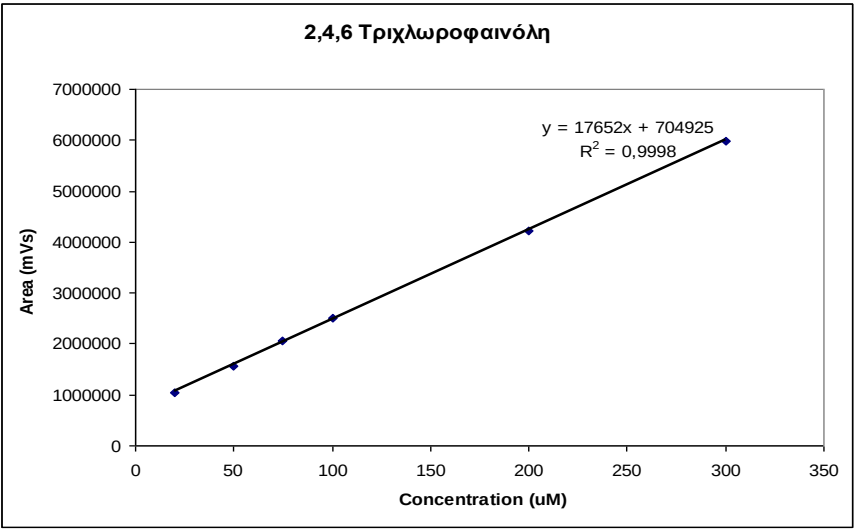
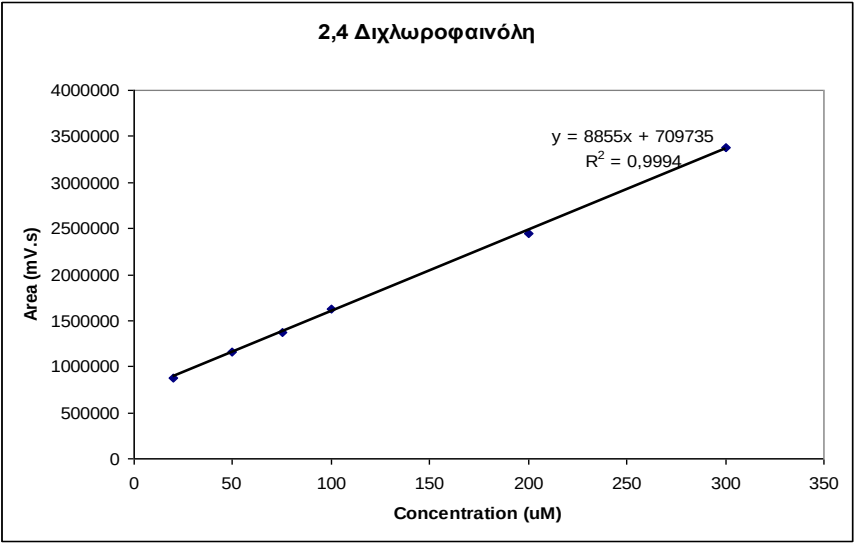
Υπολογισμός K_{ow}

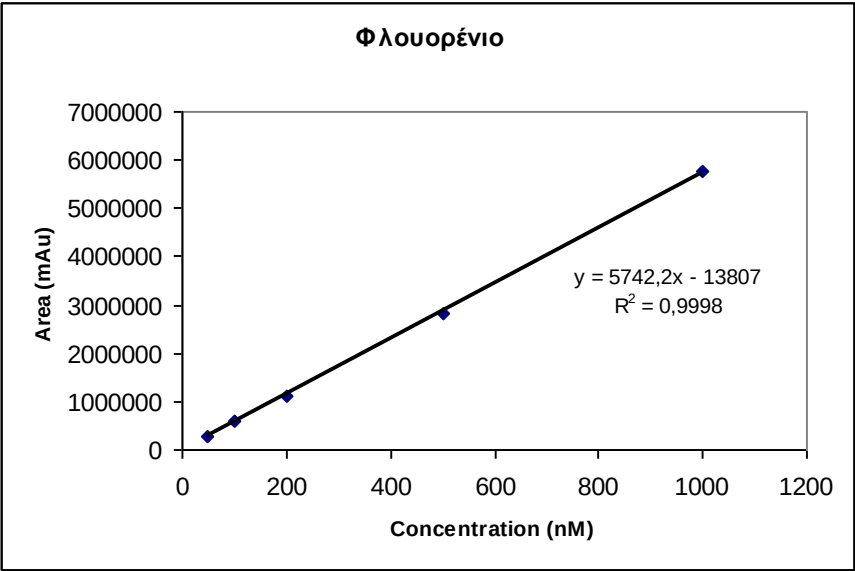
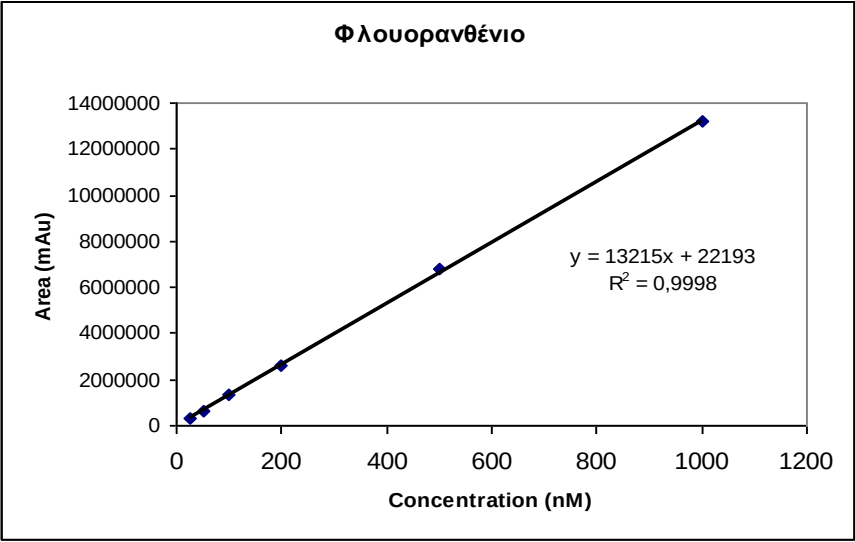
Για να γνωρίζουμε την επαναληψιμότητα της μέτρησης κάνουμε δύο επαναλήψεις της διαδικασίας και λαμβάνουμε από τις αναλύσεις στην HPLC δύο τιμές επιφάνειας κορυφών (peak area). Υπολογίζουμε το μέσο όρο τους και με χρήση της καμπύλης βαθμονόμησης από οκτανολικά διαλύματα της ένωσης προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση της ένωσης αυτής στη φάση της οκτανόλης C_{oct}. Γνωρίζουμε ότι $K_{ow} = C_{oct}/C_w$, οπότε πρέπει να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση της ένωσης στην υδατική φάση, C_w. Αυτή μπορεί να βρεθεί αν εφαρμόσουμε διατήρηση μάζας για την ένωση, καθώς κάποια από τα mol της ένωσης που είχαμε αρχικά στα 10 mL νερού παρέμειναν στην υδατική φάση και τα υπόλοιπα μεταφέρθηκαν στην οκτανόλη. Ισχύει λοιπόν: n_{αρχικά}, w = n_{τελικά}, w + n_{oct}.

ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΟΚΤΑΝΟΛΗ









ΑΝΑΦΟΡΑ

Ομάδα	
Χημική ένωση	
Αρχική συγκέντρωση	
Area	
Area	
M.O Area	

ΑΣΚΗΣΕΙΣ

1. Να δώσετε επιγραμματικά βιβλιογραφικές πληροφορίες για τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ένωσης που καλείστε να μελετήσετε, καθώς επίσης τις πηγές και την τύχη αυτής στο περιβάλλον

2. Γνωρίζοντας ότι $K_{ow}=C_{oct}/C_w$ υπολογίστε το K_{ow} της ένωσής σας, αν γνωρίζετε την εξίσωση που ορίζει τη σχέση γραμμικότητας της συγκέντρωσης (concentration σε nM ή μM) ως προς την επιφάνεια (area) της εν λόγω εκλούμενης κορυφής που αντιστοιχεί για κάθε ένωση (η οποία έχει υπολογιστεί χρησιμοποιώντας διάφορα οκτανολικά διαλύματα για κάθε ένωση).

3. Συγκρίνετε την τιμή K_{ow} της ένωσής σας με άλλες της βιβλιογραφίας. Τι πληροφορίες σας δίνει η τιμή K_{ow} που βρήκατε για το χαρακτήρα και προτιμήσεις της ένωσής σας όσον αφορά την κατανομή της στο περιβάλλον και στον άνθρωπο;

4. Περιγράψτε σύντομα μια άλλη μεθοδολογία πειραματικού προσδιορισμού της τιμής K_{ow} ενώσεων και συζητήστε τις διαφορές τους.