



Uniwersytet
Gdański



Katedra Analizy Środowiska

**Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych
z Technik chromatograficznych w praktyce**

Ćwiczenie 3

**Rozdział, analiza i identyfikacja pochodnych fenolu metodą
wysokosprawnej chromatografii cieczowej**

Gdańsk, 2024

1. Wprowadzenie

Fenol i jego pochodne to związki o dużej toksyczności. Za ich obecność w środowisku w głównej mierze odpowiedzialny jest przemysł, a tylko niewielka ich ilość jest wynikiem procesów naturalnych. Chociaż fenol to jeden konkretny związek, w literaturze używa się pojęcia fenole dla całej grupy związków, w skład której wchodzi wodorotlenowe pochodne benzenu, a także inne aromatyczne hydroksyzwiązki. Ze względu na właściwości bakteriobójcze przez długie lata fenole były składnikami środków dezynfekcyjnych m.in. w szpitalach. Ich obecność w wodzie lub żywności, poza zapachem, wpływa także na pogorszenie smaku. Oprócz niewątpliwie nieprzyjemnych wrażeń węchowych i smakowych, niebezpieczna jest przede wszystkim ich działalność w naszym organizmie.

Pentachlorofenol, 2,4-dichlorofenol oraz 2,6-dichlorofenol znajdują się w grupie związków potencjalnie rakotwórczych. Dwa ostatnie a także *o*-chlorofenol i *p*-chlorofenol powstają podczas procesu chlorowania wody. Agencja Ochrony Środowiska (ang. *Environmental Protection Agency*, US EP) jako szczególnie szkodliwe uznała 11 fenoli: fenol, *o*-chlorofenol, *o*-nitrofenol, *p*-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol, 2,4dimetylofenol, 4-chlorokrezol, 2,4-dichlorofenol, 4,6-dinitro-*o*-krezol, 2,4,6-trichlorofenol i pentachlorofenol.

1.1. Chlorofenole w środowisku

Chlorofenole to ogólna nazwa pochodnych fenolu, w którym jeden lub więcej atomów wodoru jest zastąpiony atomem chloru. Wyróżnia się 5 podstawowych grup chlorofenoli: monochlorofenole, dichlorofenole, trichlorofenole, tetrachlorofenole i pentachlorofenol. W sumie tworzą one 19 różnych kongenerów (**Tabela 1**). Wszystkie chlorofenole charakteryzują się bardzo intensywnym zapachem wyczuwalnym w wodzie nawet na poziomie ppb (części na miliard).

Niektóre z chlorofenoli, jak np. 4-chlorofenol, stosowane są jako składniki preparatów dezynfekcyjnych. Inne, z co najmniej dwoma atomami chloru, znalazły zastosowanie jako pestycydy lub półprodukty do ich produkcji. Chlorofenole powstają także jako produkt uboczny w czasie dezynfekcji wody w wyniku chlorowania substancji humusowych. Niektóre chlorofenole pojawiają się w środowisku także w wyniku foto- lub biodegradacji innych substancji chemicznych, np. kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego.

Tabela 1. Zestawienie 19 kongenerów chlorofenoli wraz ze stosowanymi skrótami

Monochlorofenole 2-chlorofenol (2-CP) 3-chlorofenol (3-CP) 4-chlorofenol (4-CP)	Trichlorofenole 2,3,4-trichlorofenol (2,3,4-TCP) 2,3,5-trichlorofenol (2,3,5-TCP) 2,3,6-trichlorofenol (2,3,6-TCP) 2,4,5-trichlorofenol (2,4,5-TCP) 2,4,6-trichlorofenol (2,4,6-TCP) 3,4,5-trichlorofenol (3,4,5-TCP)
Dichlorofenole 2,3-dichlorofenol (2,3-DCP) 2,4-dichlorofenol (2,4-DCP) 2,5-dichlorofenol (2,5-DCP) 2,6-dichlorofenol (2,6-DCP) 3,4-dichlorofenol (3,4-DCP) 3,5-dichlorofenol (3,5-DCP)	Tetrachlorofenole 2,3,4,5-tetrachlorofenol (2,3,4,5-TeCP) 2,3,4,6-tetrachlorofenol (2,3,4,6-TeCP) 2,3,5,6-tetrachlorofenol (2,3,5,6-TeCP) Pentachlorofenol (PCP)

Najbardziej toksycznym i uciążliwym chlorofenolem w środowisku jest pentachlorofenol PCP, stosowany głównie jako herbicyd do niszczenia młodych chwastów dwuliściennych (fungicyd) oraz jako środek do zaprawiania drewna. Techniczny preparat PCP może być zanieczyszczony polichlorodibenzodiosksynami (PCDDs) i polichlorodibenzofuranami (PCDFs), co znacznie podnosi jego działanie toksyczne. Innym źródłem PCP w środowisku jest przemysł celulozowo-papierniczy, a także rozpad innych pestycydów, tj. lindanu lub heksachlorobenzenu. PCP wchłania się do ustroju przez przewód pokarmowy, skórę oraz układ oddechowy. Bez względu na drogę narażenia, PCP jest związkiem toksycznym (LD_{50} 27-205 mg/kg m.c.), wykazującym u ludzi działanie silnie drażniące na skórę i błony śluzowe. Przy bezpośrednim kontakcie wywołuje stany zapalne skóry i oparzenia, a przy wielokrotnym działaniu – trądzik chlorowy i czyraczność. Badania toksykologiczne wykazują, iż wysokie dawki PCP mogą wpływać na rozwój kancerogenezy i mutagenności zwierząt.

Chlorofenole przedostają się do środowiska głównie ze źródeł rolniczych (pestycydy) i w większości trafiają do wód powierzchniowych. Stosunkowo niska rozpuszczalność chlorofenoli w wodzie zwiększa się w wodach morskich wskutek tworzenia się soli potasowych i/lub sodowych. Ich emisja do atmosfery jest ograniczona stosunkowo niską lotnością tych związków. W warstwach powierzchniowych wód chlorofenole ulegają przemianom fotochemicznym, prowadzącym do powstania nowych związków o różnym stopniu toksyczności i trwałości, np. fotodegradacja PCP prowadzi do powstania około 30 nowych związków chemicznych: pochodnych fenoli, katecholi, alkoholi i kwasów

karboksylowych. W wodach chlorofenole ulegają stopniowej adsorpcji w osadach dennych, gdzie ulegają biodegradacji z udziałem mikroorganizmów.

Głównym źródłem narażenia człowieka na toksyczne działanie chlorofenoli jest woda pitna po dezynfekcji, zawierająca 4-chlorofenol, 2,4,5-trichlorofenol lub 2,4,6-trichlorofenol.

1.2. Dopuszczalne stężenia chlorofenoli w wodach i glebie

Dopuszczalna zawartość fenoli, oznaczana jako suma wszystkich pochodnych fenolu (indeks fenolowy) określa załącznik nr 1 do rozporządzenia Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej z dnia 29 sierpnia 2019 roku. Wartości graniczne indeksu fenolowego, w zależności od klasy jakości wody, przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Wartości graniczne indeksu fenolowego, w zależności od klasy jakości wody (na podstawie Załącznika 1 do rozporządzenia Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej z dnia 29 sierpnia 2019 r.

Fenole (indeks fenolowy) [mg/l]	Klasa jakości wody		
	A1 (wody wymagające prostego uzdatniania fizycznego, w szczególności filtracji oraz dezynfekcji)	A2 (wody wymagające typowego uzdatniania fizycznego i chemicznego, w szczególności utleniania wstępnego, koagulacji, flokulacji, dekantacji, filtracji oraz dezynfekcji przez chlorowanie końcowe)	A3 (wody wymagające wysokosprawnego uzdatniania fizycznego i chemicznego lub metod biologicznych, w szczególności utleniania, koagulacji, flokulacji, dekantacji, filtracji, adsorpcji na węglu aktywnym oraz dezynfekcji przez ozonowanie lub chlorowanie końcowe)
	0,001*	0,005*	0,1*

*wody spełniają wymagania, jeżeli wskaźniki jakości wody oznaczone gwiazdką * nie są przekraczane w 95% próbek dla danej kategorii jakości wody

Chlorofenole, zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. w sprawie sposobu prowadzenia oceny zanieczyszczenia powierzchni ziemi, zostały uznane za substancje powodujące ryzyko szczególnie istotne dla ochrony powierzchni ziemi. Ich dopuszczalna zawartość w glebie, określona dla głębokości 0–0,25 m ppt, wynosi **0,01 mg/kg** suchej masy części ziemistych gleby (<2 mm). Wyjątek stanowi IV grupa gruntów, do której zaliczane są tereny przemysłowe, użytki kopalne, tereny komunikacyjne, w tym: drogi, tereny

kolejowe, inne tereny komunikacyjne, oraz grunty przeznaczone pod budowę dróg publicznych lub linii kolejowych, dla których dopuszczalna zawartość chlorofenoli wynosi **1 mg/kg** suchej masy części ziemistych gleby (<2 mm). Wartości te określone są dla tzw. chlorofenoli pojedynczych, które wg ww Rozporządzenia uwzględniają: monochlorofenole (suma), dichlorofenole (suma), trichlorofenole (suma), tetrachlorofenole (suma) i pentachlorofenol.

1.3. Wyznaczanie log P

Hydrofobowość (lipofilność) substancji zanieczyszczających środowisko jak i leków oraz innych ksenobiotyków jest cechą w dużym stopniu wpływającą na ich właściwości farmakodynamiczne, farmakokinetyczne, toksyczność czy współczynniki biokoncentracji. Szerokie zastosowanie ma parametr hydrofobowości – logarytm współczynnika podziału związku między n-oktanołem a wodą podczas szacowania zagrożeń wynikających z chemicznego zanieczyszczenia środowiska. Współczynnik podziału P określany jako stosunek równowagowych stężeń rozpuszczonej substancji w układzie n-oktanol/woda jest podstawową miarą lipofilowości związku chemicznego.

1.3.1. Metoda chromatograficzna

Pomiędzy log P a parametrami retencji z RP HPLC można zauważyć ścisłą zależność jeżeli układ chromatograficzny przypomina układ podziałowy n-oktanol/woda. Dlatego też współczynnik podziału można wyznaczać metodami pośrednimi, z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) lub metodami obliczeniowymi.

W przypadku metody z wykorzystaniem HPLC zakłada się, iż retencja badanej substancji w odwróconym układzie faz odpowiada jej podziałowi pomiędzy dwie nie mieszające się fazy i jako taka jest proporcjonalna do współczynnika podziału P. Podstawowa zaleta oznaczania hydrofobowości tą metodą to możliwość użycia modyfikatorów organicznych jako składników binarnych (dwuskładnikowych) eluentów. Jednak obecność modyfikatora organicznego powoduje podniesienie stopnia skomplikowania natury oddziaływań wpływających na rozdział chromatograficzny. Przy zastosowaniu ustalonego składu eluentu badany związek może okazywać się bardziej hydrofobowy niż inny związek, podczas gdy sytuacja taka może przedstawiać się odwrotnie przy innym składzie eluentu. Dlatego też stosuje się metodę polegającą na wykreśleniu log k względem procentowej objętościowej zawartości modyfikatora. W trakcie przemieszczania się przez kolumnę chromatograficzną badana substancja ulega podziałowi pomiędzy hydrofobową warstwę w fazie stacjonarnej a polarnym rozpuszczalnikiem w fazie ruchomej. Podobnie jak to ma

miejsce w metodzie wyznaczania równowagowego współczynnika podziału pomiędzy oktanołem a wodą, im bardziej substancja będzie lipofilową tym większe będzie jej powinowactwo do stacjonarnej fazy hydrofobowej. W praktyce oznacza to, iż w układzie chromatograficznym substancja taka będzie dłużej zatrzymywana, a więc wzrastać będzie jej czas retencji. Dla dużej grupy związków chemicznych wykazano liniową zależność pomiędzy czasem retencji a współczynnikiem podziału wg następującego równania:

$$\log P = a \log t_R + b \quad (1)$$

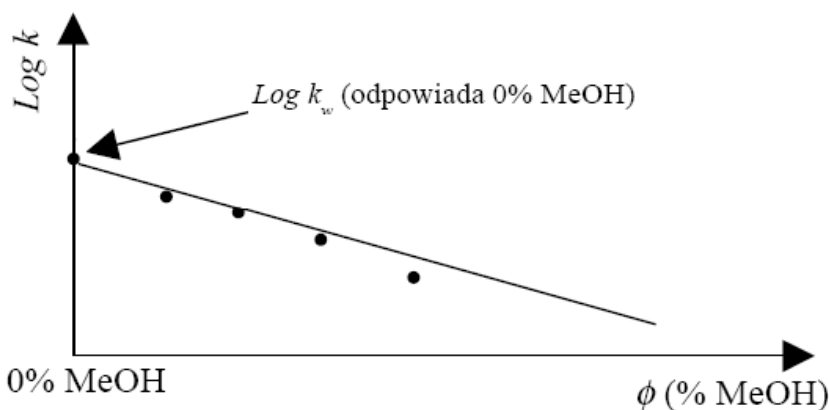
Przy czym a i b są charakterystyczne dla danej grupy związków (homologów, kongenerów, izomerów itp.).

Należy jednak zauważyć, iż pomiędzy współczynnikiem podziału n -oktanol/woda a współczynnikiem wyznaczonym metodą chromatograficzną występuje różnica w składzie faz. O ile można przyjąć, iż stacjonarna faza hydrofobowa oraz wolne ugrupowania silanolowe na powierzchni krzemionki przypominają do pewnego stopnia strukturę n -oktanolu, o tyle faza polarna zawiera nie tylko wodę lecz również modyfikator organiczny jakim jest metanol. Powoduje to, że układ chromatograficzny zawiera dodatkowy czynnik wpływający na rozpuszczalność, a tym samym na podział badanej substancji, co zwłaszcza przy wysokiej zawartości metanolu może poważnie zakłócić omawianą korelację. Logicznym wydałoby się więc użycie czystej wody jako fazy ruchomej. Jest to jednak niemożliwe w odwróconym układzie faz, w którym silnie uwodnione układy wywołują efekt „kładzenia” się podstawników alkilowych, co znacznie ogranicza sprawność kolumny chromatograficznej. Dlatego do chromatograficznego wyznaczania współczynnika podziału przyjęto używać się metodę ekstrapolacyjną. W skrócie, polega ona na wyznaczeniu czasów (współczynników) retencji badanego związku dla kilku faz ruchomych o różnej zawartości metanolu i wykreśleniu powstałej zależności według następującego, liniowego równania:

$$\log k = \log k_w - S\phi \quad (2)$$

nazywanego równaniem Snydera-Soczewińskiego, które jest jedną z podstawowych zależności w chromatografii w odwróconym układzie faz. W równaniu, k to współczynnik retencji (lub współczynnik objętościowy); k_w to wartość współczynnika retencji odpowiadająca fazie zawierającej wyłącznie wodę (0% metanolu). Z podanych powyżej ograniczeń wartość tę wyznacza się ekstrapolując wyniki uzyskane dla faz zawierających metanol do punktu przecięcia z osią y . Stąd, $\log k_w$ uznaje się za chromatograficzny współczynnik podziału (odpowiadający podziałowi pomiędzy wodę a fazę hydrofobową). S to nachylenie wykreślonej prostej, charakterystyczne dla

badanego związku a ϕ to udział metanolu w fazie ruchomej (%). Rysunek 1 przedstawia opisaną zależność.



Rysunek 1. Zależność Snydera – Soczewińskiego, z której wyznacza się chromatograficzny współczynnik podziału $\log k_w$

1.3.2. Metoda obliczeniowa

Jedną z metod obliczeniowych, służących wyznaczeniu wartości $\log P$ jest metoda Rekkera w której wartość $\log P$ jest obliczana z następującej zależności:

$$\log P = \sum_i a_i f_i + \sum_j C_j \quad (3)$$

gdzie f_i reprezentuje różne stałe fragmentów cząsteczki, natomiast a_i , częstotliwość ich występowania w badanej cząsteczce. Składniki korekcji są wyrażone jako całkowita wielokrotność pojedynczej stałej C_j . Stałe fragmentu f_i , i C_j zostały ustalone z wykazu z ponad tysiąca doświadczalnych wartości współczynnika podziału P . Dla prostych cząsteczek, równanie przyjmuje uproszczoną postać, gdzie suma składników korekcji wynosi 0,229:

$$\log P = \sum_i a_i f_i + 0,229 \quad (4)$$

1.3.3. Wybrane parametry retencji

Całkowitym czasem retencji t_R nazywamy czas, jaki upływa między wprowadzeniem próbki a pojawieniem się maksimum piku rozpatrywanego składnika próbki (**Rysunek 3**).

Całkowity czas retencji jest sumą czasu, w którym substancja oddziałuje z wypełnieniem kolumny i czasu potrzebnego do przejścia tej substancji od dozownika do detektora, gdyby takiego oddziaływania nie było.

Składnik niezatrzymywany przez fazę stacjonarną pojawia się w wycieku po czasie t_M , nazywanym **czasem retencji substancji niezatrzymywanej** lub **zerowym czasem retencji**.

Czas retencji związany z przebywaniem substancji w kolumnie tylko w wyniku oddziaływania tej substancji z wypełnieniem kolumny nazywany jest **zredukowanym czasem retencji t'_R** :

$$t'_R = t_R - t_M \quad (5)$$

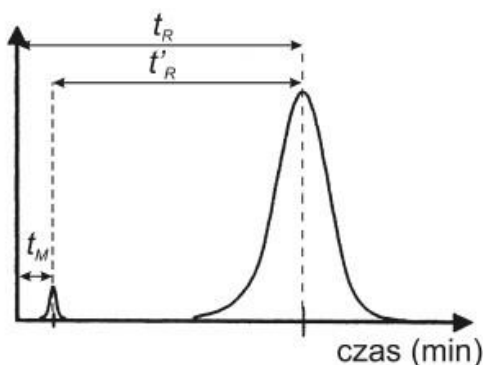
W niektórych przypadkach korzystne jest posługiwanie się **objętościami retencji**. Otrzymuje się je, mnożąc czas retencji [min] przez objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej (F_c) [ml/min]:

$$\text{całkowita objętość retencji} \quad V_R = t_R \cdot F_c \quad (6),$$

$$\text{objętość retencji substancji niezatrzymywanej} \quad V_M = t_M \cdot F_c \quad (7),$$

$$\text{zredukowana objętość retencji} \quad V'_R = t'_R \cdot F_c \quad (8).$$

Objętość retencji jest wielkością, która w odróżnieniu od czasu retencji nie zależy od liniowej prędkości przepływu fazy ruchomej v [cm/min].



Rysunek 2. Chromatogram HPLC-UV

Współczynnik retencji k jest to stosunek ilości substancji w fazie stacjonarnej do ilości substancji w fazie ruchomej. Jeśli c_S i c_M oznaczają odpowiednio równowagowe stężenia

substancji (wyrażone w molach) w fazie stacjonarnej i ruchomej a V_S i V_M są objętościami tych faz w kolumnie, to:

$$k = \frac{c_S \cdot V_S}{c_M \cdot V_M} = K \frac{V_S}{V_M} \quad (9)$$

Wielkość $K = c_S/c_M$ nazywa się stałą podziału substancji między dwie fazy.

Współczynnik retencji k można łatwo obliczyć, wykorzystując zmierzone wartości retencji:

$$k = (t_R - t_M) / t_M = t'_R / t_M = (V_R - V_M) / V_M = V'_R / V_M \quad (10)$$

Im większa jest wartość współczynnika retencji, tym silniej substancja oddziałuje z wypełnieniem kolumny. Z powyższej zależności wynika, że:

$$t_R = t_M (1 + k) \quad (11)$$

natomiast:

$$V_R = V_M (1 + k) \quad (12)$$

Moc fazy ruchomej powinna być tak dobrana, aby wartości k znalazły się w przedziale 0,5- 10. Gdy oznaczany składnik występuje w małym stężeniu, należy, jeśli to możliwe, ustalić dla niego wartość k nieco poniżej 1 (uzyskujemy wówczas maksymalną czułość). Jeśli $k > 10$, wydłuża się czas analizy, a nie polepsza się stopień rozdzielania.

2. Część eksperymentalna

2.1. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie wartości log P nieznanego związku chemicznego będącego pochodną fenolu i jego identyfikacja na podstawie tej wartości, a także porównanie metody chromatograficznej i obliczeniowej wyznaczania lipofilowości związków chemicznych na przykładzie pochodnych fenolu.

2.2. Wykonanie doświadczenia

Warunki analiz HPLC-UV

- Kolumna Hypersil Gold C18_{aq}, 150x4 mm, 3 μ m;
 - Faza ruchoma: (B)MeOH/(A)Woda;
 - Warunki izokratyczne: **(a)** 80B:20A, v/v; **(b)** 70B:30A, v/v; **(c)** 60B:40A, v/v
- (a):**
- Przepłukać zestaw pierwszą z przygotowanych faz (**80% MeOH w H₂O**) – 10 min.
 - Wprowadzić do dozownika **roztwór wzorcowy mieszaniny chloro- i alkilofenoli**. Przed analizą należy przemyć kilkakrotnie badaną próbą strzykawkę i pętlę dozownika. Z chromatogramu odczytać czasy retencji substancji wzorcowych. Analizę wykonać dwukrotnie. Wyniki umieścić w **Tabeli I**.
 - Wprowadzić do dozownika **roztwór nieznanej substancji** po uprzednim przemyciu strzykawki i pętli dozownika. Z chromatogramu odczytać czas retencji substancji nieznanej. Analizę wykonać dwukrotnie. Wyniki umieścić w **Tabeli I**.
- (b):**
- Zmienić fazę ruchomą na **70% MeOH w H₂O** i płukać nią cały zestaw 15 min.
 - Wprowadzić do dozownika **roztwór wzorcowy mieszaniny chloro- i alkilofenoli**. Przed analizą należy przemyć kilkakrotnie badaną próbą strzykawkę i pętlę dozownika. Z chromatogramu odczytać czasy retencji substancji wzorcowych. Analizę wykonać dwukrotnie. Wyniki umieścić w **Tabeli II**.
 - Wprowadzić do dozownika **roztwór nieznanej substancji** po uprzednim przemyciu strzykawki i pętli dozownika. Z chromatogramu odczytać czas retencji substancji nieznanej. Analizę wykonać dwukrotnie. Wyniki umieścić w **Tabeli II**.
- (c):**
- Zmienić fazę ruchomą na **60% MeOH w H₂O** i płukać nią cały zestaw 15 min.
 - Wprowadzić do dozownika **roztwór wzorcowy mieszaniny chloro- i alkilofenoli**. Przed analizą należy przemyć kilkakrotnie badaną próbą strzykawkę i pętlę dozownika. Z chromatogramu odczytać czasy retencji substancji wzorcowych. Analizę wykonać dwukrotnie. Wyniki umieścić w **Tabeli III**.
 - Wprowadzić do dozownika **roztwór nieznanej substancji** po uprzednim przemyciu strzykawki i pętli dozownika. Z chromatogramu odczytać czas retencji substancji nieznanej. Analizę wykonać dwukrotnie. Wyniki umieścić w **Tabeli III**.

Techniki chromatograficzne w praktyce

Rozdział, analiza i identyfikacja pochodnych fenolu metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Tabela I. Wyniki chromatograficzne dla rozdziału przy użyciu fazy 80% MeOH w H₂O

Związek	t_R [min]	t_M [min]	t'_R [min]	szerokość sygnału przy podstawie w_b [min]	szerokość sygnału w połowie wysokości $w_{1/2}$ [min]
4-chlorofenol					
2,6-dimetylofenol					
3,5-dichlorofenol					
2,4,5-trichlorofenol					
związek X					

Tabela II. Wyniki chromatograficzne dla rozdziału przy użyciu fazy 70% MeOH w H₂O

Związek	t_R [min]	t_M [min]	t'_R [min]	szerokość sygnału przy podstawie w_b [min]	szerokość sygnału w połowie wysokości $w_{1/2}$ [min]
4-chlorofenol					
2,6-dimetylofenol					
3,5-dichlorofenol					
2,4,5-trichlorofenol					
związek X					

Tabela III. Wyniki chromatograficzne dla rozdziału przy użyciu fazy 60% MeOH w H₂O

Związek	t_R [min]	t_M [min]	t'_R [min]	szerokość sygnału przy podstawie w_b [min]	szerokość sygnału w połowie wysokości $w_{1/2}$ [min]
4-chlorofenol					
2,6-dimetylofenol					
3,5-dichlorofenol					
2,4,5-trichlorofenol					
związek X					

2.3. Opracowanie wyników

Należy:

- wyznaczyć współczynnik retencji k każdego ze związków dla każdego składu fazy ruchomej i przedyskutować;
- wyznaczyć rozdzielczość między analizowanymi związkami R_S i przedyskutować;
- wyznaczyć współczynniki selektywności α i przedyskutować;
- wykreślić zależność $\log k$ od procentowego udziału MeOH w fazie ruchomej dla każdego z analizowanych związków (wzorcowe pochodne fenolu oraz substancja X), zgodnie z równaniem Snydera-Soczewińskiego i odczytać wartość $\log k_w$ dla każdego związku;
- dla każdej z wzorcowych pochodnych fenolu należy obliczyć współczynniki lipofilowości ($\log P_{obl}$) korzystając z równania 4 oraz wybranych współczynników cząstkowych dla fazy MeOH/woda przedstawionych poniżej:

Grupa funkcyjna	f_i
Alifatyczny – CH ₃	0,5473
Alifatyczny – CH ₂	0,4911
Aromatyczny C lub -CH	0,2940
Cl – połączony z arom.	0,6445
OH – połączony z arom.	-0,4802
Br – połączony z arom.	0,8900
Aromatyczny – NH ₂	-0,8540

- wartości $\log k_w$ dla wzorcowych pochodnych fenolu należy porównać (skorelować) z:

- obliczonymi wartościami ($\log P_{obl}$), wyznaczyć współczynnik korelacji liniowej R^2 i przedyskutować uzyskane wyniki;
- literaturowymi eksperymentalnymi wartościami ($\log P_{lit}$) dla wzorcowych pochodnych fenolu, wyznaczyć współczynnik korelacji liniowej R^2 i przedyskutować uzyskane wyniki;

- znając $\log k_w$ nieznanej substancji X, odczytać jej $\log P$ z zależności dla wzorców: $\log P_{obl} = f(\log k_w)$ jak i $\log P_{lit} = f(\log k_w)$ i sprawdzić, który to związek z poniższej listy oraz przedyskutować wyniki;

- 3,4,5-trichlorofenol,
- 2,3,6-trimetylofenol,
- 2-bromo-3-metylofenol,
- 4-aminofenol,
- 4-bromofenol,
- 2,5-dichloro-3-bromofenol, 4,5-dibromofenol.

2.4. Odczynniki i akcesoria laboratoryjne

- roztwory wzorcowe 4-chlorofenolu, 3,5-dichlorofenolu, 2,6-dimetylofenolu, 2,4,5-trichlorofenolu i nieznanego związku w metanolu,
- metanol czystości HPLC, woda dejonizowana,
- strzykawka do HPLC poj 50-100 µl – 1 szt.,
- metanol do mycia strzykawki – 50 ml.

3. Literatura:

1. Szczepaniak W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, W-wa, 1996.
4. Witkiewicz Z., *Podstawy chromatografii*, WNT, W-wa, 1995, 2005.
5. Pod redakcją Piotrowski J.K., *Podstawy toksykologii*, WNT, W-wa, 2006.
6. Pod redakcją Biziuk M., *Pestycydy, występowanie, oznaczanie i unieszkodliwianie*, WNT, W-wa, 2001.
7. Baird C., Cann M., *Environmental Chemistry*. W.H. Freeman and Co., 2005.
8. Pod redakcją Namieśnik J., Jamróiewicz Z., *Fizykochemiczne metody kontroli zanieczyszczeń środowiska*, WNT, W-wa, 1998.