



Pracownia studencka
Zakład Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 1

OKREŚLANIE WARTOŚCI WSPÓŁCZYNNIKA PODZIAŁU OKTANOL-WODA METODAMI KLASYCZNYMI: NIEPEWNOŚCI I ICH ŹRÓDŁA

Chemia zanieczyszczeń środowiska

Gdańsk, 2014

1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Współczynnik podziału *n*-oktanol – woda (*P* lub *K_{ow}*) jest jednym z najczęściej stosowanych parametrów fizykochemicznych, służących do oceny potencjalnych losów środowiskowych substancji zanieczyszczających. Definiowany jest jako równowagowy stosunek stężeń substancji w układzie dwufazowym, który w przypadku jednej substancji jest stały dla danego układu rozpuszczalników, w określonej temperaturze oraz przy stałym ciśnieniu:

$$P = \frac{C_{okt}}{C_w} \quad (1)$$

gdzie: *C_{okt}* – stężenie molowe w oktanolu, *C_w* – stężenie molowe w wodzie.

Przyjęto, że układ *n*-oktanol – woda najlepiej odwzorowuje układy dwufazowe w środowisku naturalnym (w tym układy biologiczne). Rozpuszczalniki te po zmieszaniu tworzą dwie oddzielne fazy, przy czym ze względu na wzajemną częściową rozpuszczalność jest to układ zawierający oktanol nasycony wodą (ok. 2,3 mol/L) oraz wodę nasyconą oktanołem (ok. 4,5 x10⁻³ mol/L). Współczynnik taki mierzy się w 25°C, przy stężeniu substancji badanej nie wyższym niż 0,01 mol/L. W takim układzie, jeżeli większa ilość cząsteczek badanego związku chemicznego znajdzie się w fazie oktanolowej, to mamy do czynienia ze związkiem lipofilowym (hydrofobowym). Jeżeli zaś większość pozostanie w fazie wodnej, będzie to związek lipofobowy (hydrofilowy). W fazie oktanolowej, dominującymi staną się oddziaływania dyspersyjne pomiędzy hydrofobowymi fragmentami cząsteczki rozpuszczonego związku a łańcuchem alkilowym *n*-oktanolu, podczas gdy nieco mniejsze znaczenie odgrywać tu będą oddziaływania dipol-dipol czy wiązania wodorowe z grupą hydroksylową alkoholu. Wynika stąd jednak, iż *n*-oktanol posiada zarówno właściwości lipo- jak i hydrofilowe, a cechę taką nazywa się amfifilowością. W fazie wodnej z kolei, występować będą niemal wyłącznie wiązania wodorowe oraz oddziaływania dipol-dipol pomiędzy polarnymi fragmentami cząsteczki związku rozpuszczonego a wodą. Pomimo to w przypadku określania współczynnika podziału metodami klasycznymi zdarza się, że zamiast *n*-oktanolu stosuje się inny rozpuszczalnik organiczny, bardziej odpowiedni w stosowanej metodzie oznaczeń końcowych (np. chromatografii gazowej).

Wartość współczynnika podziału zależy zarówno od budowy chemicznej cząsteczki rozpuszczonego związku (liczba i rodzaj różnych grup funkcyjnych, udział miejsc nienasyconych, fragmentów alkilowych, wartość momentu dipolowego i in.) jak i, w dużej mierze, od jej wielkości. W trakcie mieszania obu rozpuszczalników (proces spontaniczny) całkowita entropia takiego układu gwałtownie wzrasta, jednak jej uprzywilejowany wzrost będzie ograniczany spadkiem

entropii w fazie wodnej, związanym ze stopniowym uporządkowywaniem cząsteczek wody w otoczce hydratacyjnej solwatowanego związku. Ponieważ większe rozmiary cząsteczki wymagać będą coraz większej wnęki w rozpuszczalniku (większej otoczki hydratacyjnej) powodować to będzie nieuprzywilejowany spadek entropii całego układu. W takiej sytuacji korzystniejsze termodynamicznie staje się obniżenie rozpuszczalności cząsteczek o dużych rozmiarach w fazie wodnej, co wpływa na zwiększenie współczynnika podziału. Stąd też nawet stosunkowo duże cząsteczki, ale zawierające w swojej strukturze układy nienasycone, rozgałęzione i in., ułatwiające zmniejszenie rozmiaru molekularnego, charakteryzują się dużo niższymi współczynnikami podziału od swoich analogów pozbawionych tych cech. Wartość współczynnika podziału zależy także od obecności w cząsteczce ugrupowań kwaśnych bądź zasadowych. Mając do czynienia z kwasami bądź zasadami organicznymi, kolejnym bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na podział staje się również wartość pH układu, która determinuje stopień zjonizowania substancji rozpuszczonej. W przypadku kwasów i zasad podziałowi pomiędzy fazy ulegają nie tylko związki neutralne, ale również formy zjonizowane oraz formy zasocjowane tych związków.

Współczynnik podziału oktanol – woda zmierzony dla typowych zanieczyszczeń środowiska mieści się w bardzo szerokim zakresie od 0,01 dla związków o wysokiej polarności do 10^{10} dla substancji wysoce hydrofobowych. Z tego względu, współczynnik podziału przedstawia się zwykle w formie logarytmicznej:

$$\log P = \log C_{okt} - \log C_w \quad (2)$$

Znaczenie współczynnika podziału *n*-oktanol – woda w przewidywaniu losów środowiskowych zanieczyszczeń obejmuje między innymi:

- szacowanie trwałości substancji w środowisku oraz jej tendencji do gromadzenia się w tkankach tłuszczowych organizmów (bioakumulacja) oraz przenoszenia wzdłuż łańcuchów pokarmowych (biomagnifikacja)
- określanie potencjalnego zagrożenia dla organizmów wodnych i lądowych
- ocenę możliwości poboru związku przez rośliny lądowe poprzez liście i system korzeniowy, a także możliwość transportu w organizmie roślinnym
- szacowanie możliwości gromadzenia się w określonych komponentach środowiska
- określanie potencjału do adsorpcji związku w osadach dennych i glebach o wysokiej zawartości węgla organicznego (materii organicznej)
- dobór warunków ekstrakcji związku z matryc naturalnych, oczyszczania ekstraktów oraz

wybór optymalnych technik analizy końcowej

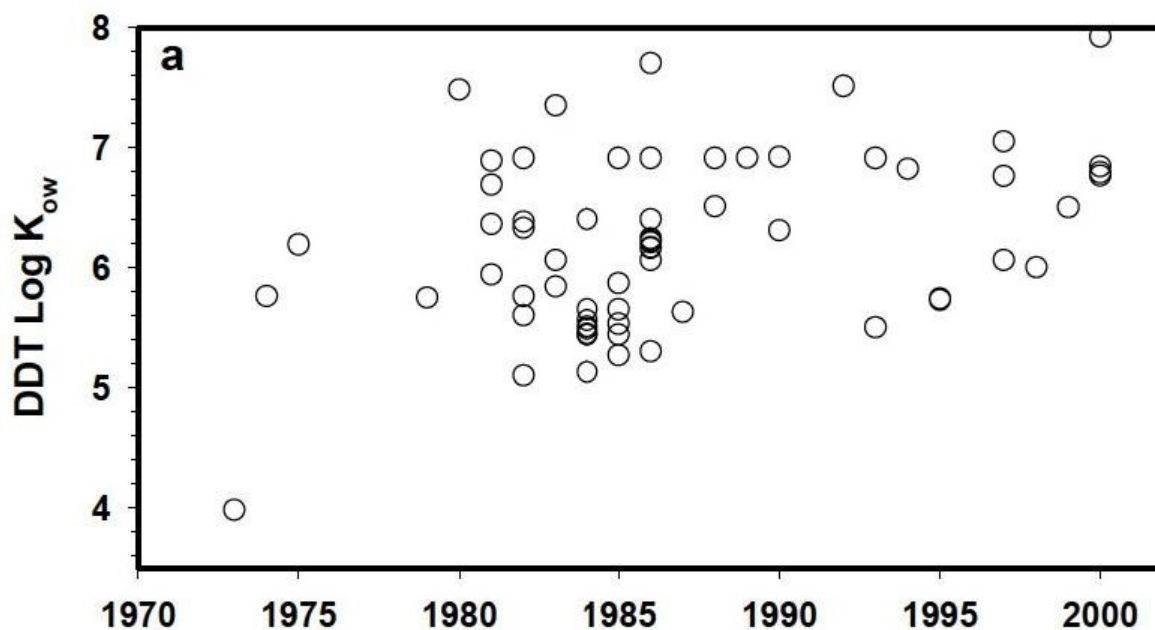
Metody wyznaczania wartości współczynnika podziału można podzielić na trzy zasadnicze grupy, różniące się zastosowanymi technikami badawczymi:

- **metody klasyczne**, polegające na wytrząsaniu lub mieszaniu niewielkiej ilości związku w układzie dwufazowym *n*-oktanol – woda
- **metody chromatograficzne**, polegające na wyznaczaniu wartości współczynnika podziału na podstawie parametrów retencyjnych badanej substancji w wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC); w tym przypadku, zakłada się, że niepolarna faza stacjonarna (zwykle żel krzemionkowy modyfikowany grupami C_{18}) odpowiada fazie oktanolowej, podczas gdy polarna faza ruchoma (zwykle mieszanina wody z metanolem) jest odpowiednikiem fazy wodnej
- **metody obliczeniowe**, zakładające stały wkład poszczególnych fragmentów cząsteczki oraz elementów strukturalnych w wartość współczynnika podziału

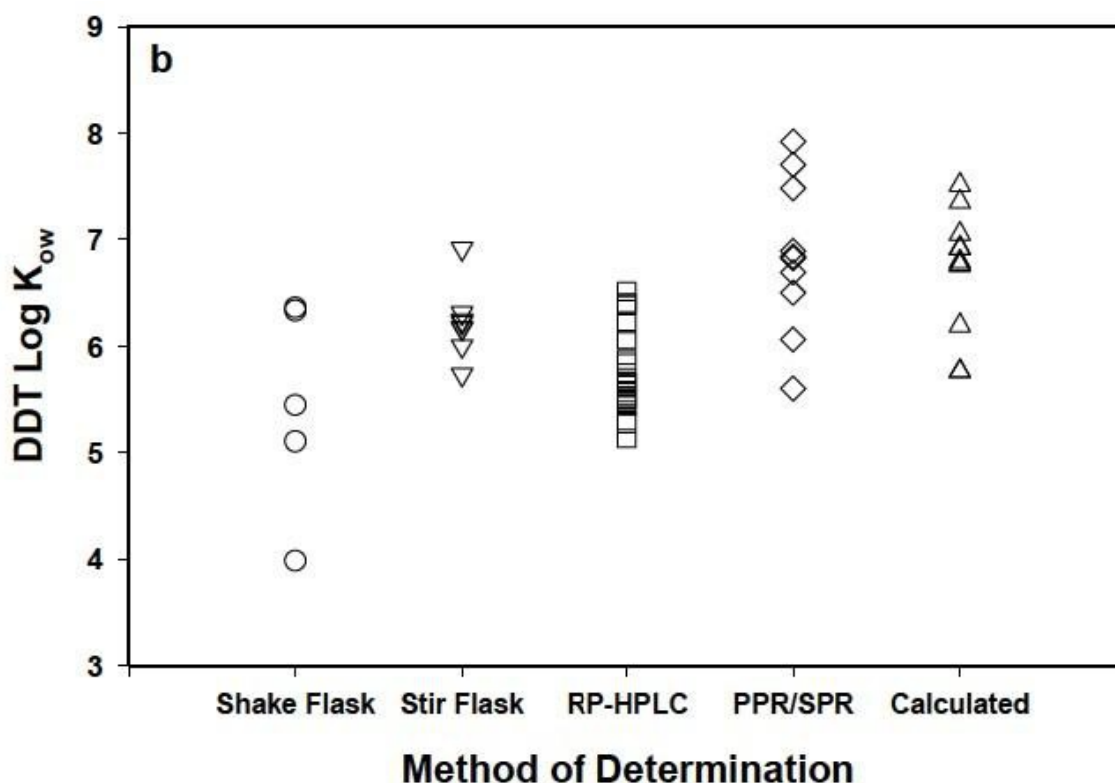
Wszystkie wyżej wymienione metody nie zapewniają pełnej wiarygodności ani wysokiej powtarzalności uzyskanych wyników. **Metody klasyczne** są najbardziej narażone na błędy popełniane podczas przeprowadzania eksperymentu. Jednocześnie, ich zastosowanie jest ograniczone do badania substancji, które nie wykazują skrajnie lipofilowego lub hydrofilowego charakteru. Wiąże się to głównie z ograniczeniami większości technik analitycznych, stosowanych do określania stężenia związku w fazie wodnej lub oktanolowej. Dla związków o bardzo wysokich lub bardzo niskich wartościach współczynnika podziału stężenie w jednej z faz może znajdować się poniżej granicy oznaczalności większości dostępnych metod. **Metody chromatograficzne** najlepiej sprawdzają się w przypadku analizy szeregu substancji o stosunkowo zbliżonych właściwościach. Ograniczenia techniczne techniki HPLC w odwróconym układzie faz sprawiają, że nie jest możliwe zastosowanie czystej wody jako fazy ruchomej. Stąd, wartość współczynnika podziału wyznaczana jest w sposób pośredni, poprzez ekstrapolację wyników uzyskanych dla faz ruchomych o różnej zawartości wody. **Metody obliczeniowe** z kolei opierają się na różnych modelach teoretycznych, które nie zawsze będą charakteryzować się wysoką uniwersalnością. Szczególnie utrudnione będzie ich stosowanie w przypadku substancji o charakterze kwasów lub zasad, gdzie pod uwagę musi być brana stała dysocjacji związku. Także zjawisko asocjacji cząsteczek substancji w badanym układzie dwufazowym jest trudne do uwzględnienia w modelach teoretycznych. Porównanie wartości współczynnika podziału *n*-oktanol – woda publikowanych dla pestycydu DDT w latach 1970-2000 jest przedstawione na Rysunku 1, zaś rozrzut wartości $\log P$ uzyskanych dla tej substancji różnymi

metodami – na Rysunku 2.

Celem ćwiczenia jest porównanie wartości $\log P$, uzyskiwanych przy zastosowaniu dwóch klasycznych metod wyznaczania tego parametru (wytrząsania oraz mieszania). Wartości będą porównywane przy użyciu prostych testów statystycznych, służących do określania istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi. Jednocześnie, porównana zostanie precyzja oznaczeń obydwoma metodami, której miarą będzie względne odchylenie standardowe (RSD) uzyskanych wartości średnich. Jako substancja modelowa zastosowana zostanie nikotyna, ze względu na umiarkowaną wartość współczynnika podziału przy odczynie warstwy wodnej zbliżonym do obojętnego. Jako technika oznaczeń końcowych użyta będzie chromatografia gazowa. Z tego względu, fazę organiczną stanowić będzie nie *n*-oktanol, a dichlorometan, który jest bardziej odpowiednim rozpuszczalnikiem w przypadku analiz wykonywanych na względnie niepolarnych fazach stacjonarnych, stosowanych w tej technice.



Rysunek 1. Wartości współczynnika podziału *n*-oktanol – woda, wyznaczanych dla DDT w latach 1970-2000 [5].



Rysunek 2. Rozrzut wartości współczynnika podziału n-oktanol – woda dla DDT, wyznaczanych za pomocą metod klasycznych, chromatograficznych oraz obliczeniowych [5].

2. WYKONANIE ĆWICZENIA

UWAGA! Nikotyna jest substancją silnie toksyczną i dobrze wchłania się przez skórę. Podczas wykonywania ćwiczenia należy zachować ostrożność oraz bezwzględnie stosować rękawiczki!

2.1. Wyznaczanie $\log P$ nikotyny poprzez wytrząsanie

Odmierzyć **cztery próbki po 15 mL** roztworu wodnego nikotyny. Przenieść próbki do rozdzielaczy o pojemności 50 mL. Dodać do wszystkich próbek po 15 mL dichlorometanu, zamknąć rozdzielacze korkiem i energicznie wytrząsać przez 10 minut. Po rozdzieleniu się warstw, warstwę organiczną przesączyć przez warstwę bezwodnego siarczanu (VI) sodu do kolb okrągłodennych o pojemności 50 mL. Do ekstraktów **dodać wzorzec wewnętrzny** (4,4'-dipirydył, ilość według wskazań prowadzącego). Odparowywać dichlorometan na wyparce rotacyjnej do objętości około 1 mL. Następnie ekstrakt przenieść ilościowo do butelek 2 mL. Uzyskane ekstrakty pozostawić do analiz.

2.2. Wyznaczanie log P nikotyny poprzez mieszanie

Odmierzyć **cztery próbki po 15 mL** roztworu wodnego nikotyny. Przenieść próbki do kolb stożkowych o pojemności 50 mL. Dodać do wszystkich próbek po 15 mL dichlorometanu, umieścić na mieszadle magnetycznym i mieszać przez 10 minut. Następnie, próbki delikatnie przenieść ilościowo do rozdzielaczy o pojemności 50 mL. Po rozdzieleniu się warstw, warstwę organiczną przesączyć przez warstwę bezwodnego siarczanu (VI) sodu do kolb okrągłodennych o pojemności 50 mL. Do ekstraktów **dodać wzorzec wewnętrzny** (4,4'-dipirydył, ilość według wskazań prowadzącego). Odparowywać dichlorometan na wyparce rotacyjnej do objętości około 1 mL. Następnie ekstrakt przenieść ilościowo do butelek 2 mL. Uzyskane ekstrakty pozostawić do analiz

2.3. Analiza chromatograficzna uzyskanych próbek

Analizę GC każdej próbki należy wykonać w następujących warunkach:

- kolumna DB-5 lub odpowiednik, długość 30 m, średnica wewnętrzna 0,25 mm, grubość filmu fazy stacjonarnej 0,25 µm
- gaz nośny argon, przepływ 1 ml/min
- temperatura dozownika i detektora FID 300°C
- temperatura kolumny początkowa: 100°C, narost temperatury 10°C/min, temperatura końcowa 280°C
- nastrzyk na kolumnę o objętości 1 µl

Masę nikotyny w każdej z próbek należy określić na podstawie stosunku pól powierzchni nikotyny i wzorca wewnętrznego zgodnie ze wzorem:

$$m_N = f \frac{A_N \times m_{IS}}{A_{IS}}$$

gdzie: m_N – masa nikotyny, A_{IS} – powierzchnia sygnału wzorca wewnętrznego, m_{IS} – masa wzorca wewnętrznego, A_N – powierzchnia sygnału nikotyny. Współczynnik odpowiedzi f należy uznać za równy 1. Masę nikotyny w warstwie wodnej obliczamy z różnicy pomiędzy początkową masą nikotyny, wziętej do eksperymentu, oraz wyznaczonej masy w fazie organicznej.

3. OPRACOWANIE WYNIKÓW

- Na podstawie uzyskanych wyników dla każdej próbki osobno obliczyć wartość współczynnika podziału i podać ją w formie logarytmicznej.
- Dla każdej z metod wyznaczania współczynnika, należy uśrednić uzyskane wartości i określić precyzję metody, obliczając względne odchylenie standardowe.
- Uzyskane wartości średnie dla dwóch metod porównać statystycznie, stosując w tym celu test t-Studenta. Obliczenia przedstawić w sprawozdaniu.
- Porównać uzyskane wartości ze współczynnikiem podziału obliczonym w programie EpiSuite (dostępny na komputerach w pracowni). Przedyskutować ewentualne rozbieżności.
- Przedstawić krótką dyskusję uzyskanych wyników, ze szczególnym uwzględnieniem różnic pomiędzy wynikami uzyskanymi różnymi metodami oraz precyzji obu metod.

4. SZKŁO I ODCZYNNIKI

- wodny roztwór nikotyny
- dichlorometan 250 mL
- dichlorometan do mycia strzykawek
- bezwodny siarczan (VI) sodu
- roztwór 4,4'-dipirydyłu w dichlorometanie
- rozdzielacz 50 mL – 4 szt.
- pipeta miarowa 25 mL – 2 szt.
- lejek mały – 4 szt.
- kolba okrągłodenna 50 mL – 4 szt.
- butelka zakręcana 2 mL – 8 szt.
- mieszadło magnetyczne – 4 szt.
- kolba stożkowa 50 ml – 4 szt.
- sączki
- strzykawka 10 μ l – 1 szt.
- strzykawka 100 μ l – 1 szt.

5. ZAKRES WYMAGANYCH WIAOMOŚCI

- Podstawowe informacje na temat współczynnika podziału *n*-oktanol – woda oraz metod jego wyznaczania

- Podstawy chromatografii gazowej (dostępne pod linkiem:
http://chemia.ug.edu.pl/sites/default/files/_nodes/strona-chemia/17399/files/slady_gc.pdf
- Testy statystyczne stosowane do porównania wartości średnich

6. LITERATURA

1. Calvet R., *Evaluation of adsorption coefficients and prediction of the mobilities of pesticides in soils*, W: *Methodological aspects of the study of pesticide behaviour in soil*, INRA, Paryż 1989
2. Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M., Imboden D.M., *Environmental Organic Chemistry*, 2nd Ed., Wiley & Sons Inc, 2002
3. Atkins P.W., *Chemia fizyczna*, PWN, Warszawa 2001
4. Pigoń K., Ruziewicz Z., *Chemia fizyczna*, PWN, Warszawa 1986
5. Pontolillo and Eganhouse (2001), U.S. Geological Survey, Water-Resources Investigations Report 01-4201