



Pracownia studencka
Katedry Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 2

**WYZNACZANIE WSPÓŁCZYNNIKA PODZIAŁU
WYBRANYCH ZANIECZYSZCZEŃ
ORGANICZNYCH ŚRODOWISKA METODĄ
WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII
CIECZOWEJ ORAZ METODĄ OBLICZENIOWĄ**

Chemiczne zagrożenia środowiska

Gdańsk, 2010

1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

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. Znaczenie tego parametru w prognozowaniu losów środowiskowych zanieczyszczeń chemicznych zostało dokładnie opisane w instrukcji nr 2 pt. „Wyznaczanie współczynnika podziału *n*-oktanol/woda dla kwasu octowego”. Jednak warto przytoczyć pewne przykłady:

1. Prognozowanie korelacji między $\log P$ i rozpuszczalnością w wodzie oraz współczynnikami biokoncentracji (BCF) jak też ich korelacje dla organizmów wodnych i lądowych (np. zależność między tym parametrem a kinetyką biokoncentracji u ryb).
1. Wzajemny związek między $\log P$ a sorpcją glebową oraz pobieraniem pestycydów przez dżdżownice i BCF dla alg.
2. O znaczeniu $\log P$ w chemii środowiska świadczą również publikacje dotyczące pestycydów i innych związków.

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.

1.1. Metoda HPLC

Hydrofobowość można zdefiniować jako tendencję danego związku do “preferowania” środowiska niewodnego względem wodnego, pojęcie to może być rozumiane jako tendencja cząsteczek związku rozpuszczonego do agregacji w roztworach wodnych. Właściwości hydrofobowe są sumą oddziaływań fizykochemicznych: orientacyjnych, indukcyjnych, dyspersyjnych, wiązania wodorowego i przeniesienia ładunku. W przypadku oddziaływań hydrofobowych siły te zależą głównie od właściwości rozpuszczalników, a nie od substancji rozpuszczonych. Od czasu wprowadzenia chromatografia cieczowa z fazami odwróconymi jest szczególnie odpowiednia do oznaczania hydrofobowości. W przypadku metody z wykorzystaniem

2. Chemiczne zagrożenia środowiska – wyznaczanie współczynnika podziału metodą HPLC 3

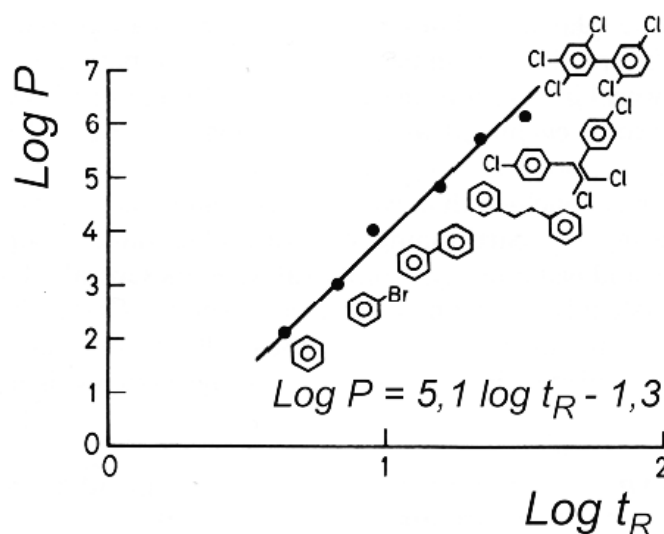
HPLC zakłada się, iż retencja badanej substancji w odwróconym układzie faz odpowiada jej podziałowi pomiędzy dwie nie mieszające się fazy i jako taka jest proporcjonalna do współczynnika podziału P . W takim układzie, jedną z faz (faza stacjonarna) stanowią ziarna krzemionki chemicznie zmodyfikowane warstwą hydrofobową złożoną z podstawników n -alkilowych o różnej długości łańcucha (C8 – C18), natomiast drugą fazę (faza ruchoma) stanowi polarny rozpuszczalnik, na ogół mieszanina wody i metanolu. 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 warstwą 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.).

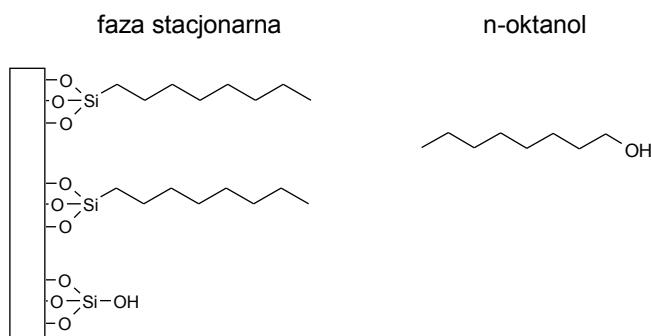
Rysunek 1 przedstawia tę korelację dla wybranych związków aromatycznych, których współczynnik podziału mieści się w szerokim zakresie 4 rzędów wielkości.

Najprostszym, praktycznym zastosowaniem tej metody jest wyznaczenie kilkunastu współczynników retencji dla grupy związków referencyjnych, o znanych współczynnikach podziału a następnie, w oparciu o uzyskaną korelację szacowanie tych współczynników dla związków nieznanych na podstawie ich czasów retencji w tych samych warunkach chromatograficznych.



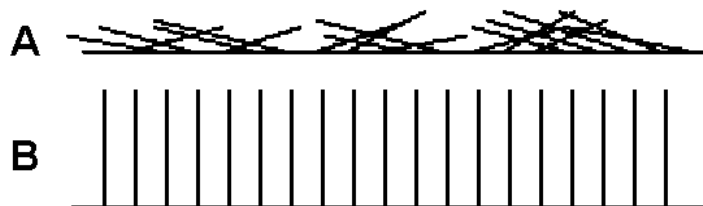
Rysunek 1. Linowa zależność pomiędzy współczynnikiem retencji $\log P$ a czasem retencji $\log t_R$.

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 (rysunek 2), 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.



Rysunek 2. Porównanie chromatograficznej fazy odwróconej i *n*-oktanolu.

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 (rysunek 3).

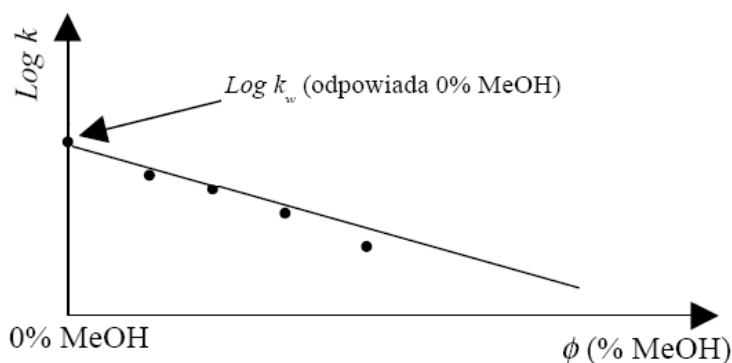


Rysunek 3. Porównanie struktury hydrofobowej fazy stacjonarnej w przypadku użycia czystej wody (A) oraz wody z metanolem (B) jako faz ruchomych.

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) wyznaczony z zależności: $k = (t_R - t_0)/t_0$, gdzie t_0 to czas martwy układu; 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 4 przedstawia opisaną zależność.



Rysunek 4. Zależność Snydera – Soczewińskiego, z której wyznacza się chromatograficzny współczynnik podziału $\log k_w$.

W metodzie HPLC substancje o bardzo niskiej rozpuszczalności w *n*-oktanolu wykazują tendencję do dawania zaniżonych wartości $\log P$. Piki takich związków czasem towarzyszą czołu rozpuszczalnika. Dzieje się tak dlatego, iż w takiej sytuacji proces podziału jest zbyt powolny do uzyskania równowagi w czasie brany pod uwagę przy zwykłym rozdzielaniu metodą HPLC. Zmniejszenie szybkości przepływu i/lub obniżenie stosunku metanol/woda może być w tym przypadku pożądane, aby uzyskać rzeczywistą wartość.

Wartość pH eluentu jest krytyczna dla związków ulegających jonizacji. Powinno być ono w obrębie zakresu roboczego pH kolumny, które zwykle wynosi między 2 i 8. Zalecane jest buforowanie. Należy zachować ostrożność, aby nie dopuścić do wytrącania się soli i zniszczenia kolumny, co zachodzi dla niektórych mieszanin faza organiczna/bufor. Pomiary HPLC faz stacjonarnych opartych na krzemionce powyżej pH 8 nie są polecane, gdyż użycie zasadowej fazy ruchomej powoduje gwałtowne pogorszenie się wydajności kolumny.

Warto dodać, iż prowadzono badania nad użyciem wypełnień innych, niż oparte na chemicznie związanej krzemionce. Przebadano między innymi następujące wypełnienia: kopolimery poli(styrenodiwinylobenzenowe), kopolimer oktadecylopoliwinyłowy, tlenek glinowy, tlenek cyrkonowy, oraz niedawno wprowadzony materiał do pakowania kolumn tzw. immobilizowana sztuczna membrana (IAM). W przypadku ODS proponuje się modyfikację fazy stacjonarnej bądź też ruchomej polegającą na np.: zastosowaniu pH od 2,5 do 3,5 i wyższych stężeń buforu, zastąpienie soli sodowych potasowymi i dodatek modyfikatorów aminowych (dimetylooktyloamina, trimetyloamina), dodanie oktanolu i decylaminy do fazy ruchomej składającej się między innymi z MeOH. Jednak nie istnieje sposób który umożliwiłby uczynienie układu RP HPLC identycznym z układem *n*-oktanol/woda.

1.2. Metody obliczeniowe

Wszystkie metody obliczeniowe są oparte o formalną fragmentację cząsteczki na odpowiednie podstruktury dla których pewne przyrosty wartości $\log P$ są znane z eksperymentu. Wartość $\log P$ całej cząsteczki jest następnie obliczana jako suma wartości odpowiadająca jej fragmentom plus suma składników korekcji dla oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych. Wiarygodność metod obliczeniowych obniża się ze wzrostem złożoności badanych związków. W przypadku prostych cząsteczek o niskiej masie cząsteczkowej i jednej lub dwu grupach funkcyjnych, można oczekiwać odchylenia od 0,1 do 0,3 jednostek $\log P$ między wynikami różnych metod fragmentaryzacji i wartościami zmierzonymi.

2. Chemiczne zagrożenia środowiska – wyznaczanie współczynnika podziału metodą HPLC 7

Jedną z pierwszych stosowanych półempirycznych metod obliczeniowych była metoda stałej podstawienia hydrofobowego π , definiowaną jako:

$$\pi_x = \log P(\text{PhX}) - \log P(\text{PhH}) \quad (3)$$

gdzie $P(\text{PhX})$ jest współczynnikiem podziału pochodnej aromatycznej, a $P(\text{PhH})$ związku macierzystego. Na przykład, chcąc wyznaczyć cząstkową hydrofobowość podstawnika chloru odejmuje się od siebie wcześniej wyznaczone współczynniki podziałów chlorobenzenu i benzenu:

$$\begin{aligned} (\text{n.p. } \pi_{\text{Cl}} &= \log P(\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}) - \log P(\text{C}_6\text{H}_6)) \\ &= 2,84 - 2,13 = 0,71 \end{aligned} \quad (4)$$

Metoda stosowana jest głównie dla podstawienia aromatycznego. Wartości dla większej liczby podstawników zostało stabelaryzowane w licznych pozycjach literaturowych. Są one stosowane dla obliczeń $\log P$ cząsteczek aromatycznych lub podstruktur.

Stosuje się również metodę Rekkera w której wartość $\log P$ jest obliczana z następującej zależności:

$$\log P = \sum_i a_i f_i + \sum_j C_j \quad (5)$$

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:

$$\log P = \sum_i a_i f_i + 0,229 \quad (6)$$

Najbardziej zaawansowanym sposobem wyznaczania współczynnika podziału jest metoda Hansch-Leo zgodnie z którą wartość $\log P$ jest obliczana z:

$$\log P = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j \quad (7)$$

gdzie f_i przedstawia różne stałe fragmentu cząsteczkowego, F_j składniki korekcji oraz a_i , b_j odpowiadające częstotliwości występowania. Wyprowadzony z doświadczalnych wartości współczynników podziału wykaz atomowych i cząsteczkowych grup wartości, oraz wykaz składników korekcji F_j zostały ustalone metodą prób i błędów. Składniki korekcji zostały uporządkowane w kilka różnych klas. Wzięcie pod uwagę wszystkich zasad i składników korekcji jest względnie skomplikowane i zużywające czas. Dlatego współcześnie istnieje szereg programów komputerowych obliczających lipofilowość związku na podstawie zadanej struktury.

2. WYKONANIE ĆWICZENIA

1. Należy zaznajomić się z podstawowymi elementami zestawu HPLC oraz ich funkcjonowaniem, sposobami zmiany natężenia przepływu w pompie, zmianą długości fali w detektorze, obsługą integratora oraz podstawowymi czynnościami nastrzyku, zmiany fazy ruchomej, zmiany kolumny itd.
2. Rozdziały będą wykonywane w układzie faz odwróconych z wykorzystaniem kolumny oktadecylosilanowej ODS (RP-18) oraz z układem elucyjnym metanol (MeOH) – woda, przy przepływie $0,8 \text{ cm}^3/\text{min}$. Każda z przygotowanych faz ruchomych powinna zostać odgazowana w łaźni ultradźwiękowej.
3. Należy przygotować po 200 ml faz zawierających: 35, 40, 50 i 60 % (v/v) MeOH.
4. Analizowane próbki to roztwory fenolu, o-nitrofenolu oraz aniliny, stężenie każdej z substancji wynosi 1 mM dm^{-3} . Dla każdej z faz ruchomych należy wykonać nastrzyk po 20 μL każdego z roztworów badanych substancji i określić czasy retencji badanych związków, a z nich wyznaczyć współczynniki retencji k . Czas martwy powinien być zmierzony poprzez wstrzyknięcie wody dla każdego z eluentów.
5. W trakcie wykonywania analiz należy obliczyć współczynniki podziału dla związków z poniższej tabeli. W tym celu proszę skorzystać z programu EpiSuite, udostępnionego przez US EPA. Po otwarciu programu wybieramy po lewej stronie okna moduł "KOWWIN", w kolejnym oknie "NameLookup", w kolejnym wpisujemy nazwę związku i potwierdzamy "OK". W otwartym oknie wyboru potwierdzamy nasz wybór lub wyszukujemy na liście żądany związek. W uzupełnionym o dane związku oknie programu KOWWIN wybieramy "Calculate". Wyniki: przewidywany współczynnik podziału (w czerwonej ramce) oraz wartość literaturową (Exp Log P) wpisujemy do tabeli. Jeśli brakuje wartości eksperymentalnej, pozostawiamy wolne miejsce. Program KOWWIN wykorzystuje do obliczeń algorytm identyczny z opisanym w ćwiczeniu.

2. Chemiczne zagrożenia środowiska – wyznaczenie współczynnika podziału metodą HPLC 9

Tabela 1. Wartości eksperymentalne i przewidywane dla szeregu homologicznego kwasów karboksylowych

Liczba atomów węgla	Nazwa	$\log P$ obliczony	$\log P$ eksperymentalny
2	acetic acid		
4	butanoic acid		
6	hexanoic acid		
8	octanoic acid		
10	decanoic acid		
12	dodecanoic acid		
14	tetradecanoic acid		
16	hexadecanoic acid		
18	octadecanoic acid		
20	eicosanoic acid		
22	docosanoic acid		
24	tetracosanoic acid		
26	hexacosanoic acid		
28	octacosanoic acid		
30	triacontanoic acid		

3. OPRACOWANIE WYNIKÓW

- Należy wykreślić zależność $\log k$ od procentowego udziału MeOH w fazie ruchomej zgodnie z równaniem Snydera-Soczewińskiego (2) i odczytać wartość $\log k_w$.
- Dla wszystkich analizowanych związków należy obliczyć współczynniki podziału korzystając z równania (6) oraz stałych fragmentów cząsteczkowych zawartych w poniżej tabeli:

Fragment	f_i
Alifatyczny -CH ₃	0.5473
Alifatyczny -CH ₂ -	0.4911
Aromatyczny C lub CH	0.2940
Cl- (połączony z aromatem)	0.6445
OH- (połączony z aromatem)	-0.4802
Aromatyczny -NH ₂	-0,9170
Br- (połączony z aromatem)	0.8900
Aromatyczny -NO ₂	-0,1823

2. Chemiczne zagrożenia środowiska – wyznaczanie współczynnika podziału metodą HPLC 10

- Następnie otrzymane wartości $\log k_w$ należy porównać (skorelować) z obliczonymi współczynnikami lipofilowości $\log P$, a dla uzyskanej zależności obliczyć współczynnik korelacji liniowej R^2 .
- Na podstawie uzupełnionej Tabeli 1 wykonaj na jednym rysunku wykresy zależności $\log P$ eksperymentalnego oraz $\log P$ przewidywanego (y) od liczby atomów węgla w cząsteczce (x). Czy przebieg obu zależności jest liniowy? Dokonaj ekstrapolacji uzyskanej zależności przewidywanej dla kwasów o 35 i 40 atomach węgla w cząsteczce. Do czego może być przydatny taki model obliczeniowy i jak oceniasz jego zgodność z rzeczywistością?

4. SZKŁO I ODCZYNNIKI

- Metanol, woda destylowana
- Roztwory fenolu, o-nitrofenolu oraz aniliny o stężeniu 1 mM dm⁻³
- Strzykawka do HPLC
- Kolby stożkowe 250 mL – 4 szt.
- Cylinder miarowy 250 mL – 2 szt.

5. ZAKRES WYMAGANYCH WIAOMOŚCI

- Podstawowe pojęcia z wysokosprawnej chromatografii cieczowej (zawarte w instrukcji do przedmiotu **ANALIZA ŚLADOWYCH ZANIECZYSZCZEŃ W ŚRODOWISKU**, **TEORIA: "HPLC – Wysokosprawna chromatografia cieczowa"**, link: http://www.chem.univ.gda.pl/analiza/dydaktyka/slady_hplc.pdf) – przede wszystkim parametry retencji!
- Współczynnik podziału, wyznaczanie tego współczynnika metodą HPLC i metodami obliczeniowymi, równanie Snydera-Soczewińskiego

6. LITERATURA

- Pigoń K., *Chemia fizyczna*, Tom I, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
- Rosset R., Kołodziejczyk H., *Współczesna chromatografia cieczowa. Ćwiczenia i zadania*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001.
- Witkiewicz Z., *Podstawy chromatografii*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2005.