



UNIwersytet Gdański
Wydział Chemii

Pracownia studencka
Katedry Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 4

WPLYW pH ŚRODOWISKA NA LIPOFILOWOŚĆ NIKOTYNY JAKO MODELOWEJ SUBSTANCJI O CHARAKTERZE ZASADOWYM

Chemiczne zagrożenia środowiska

Gdańsk, 2014

1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

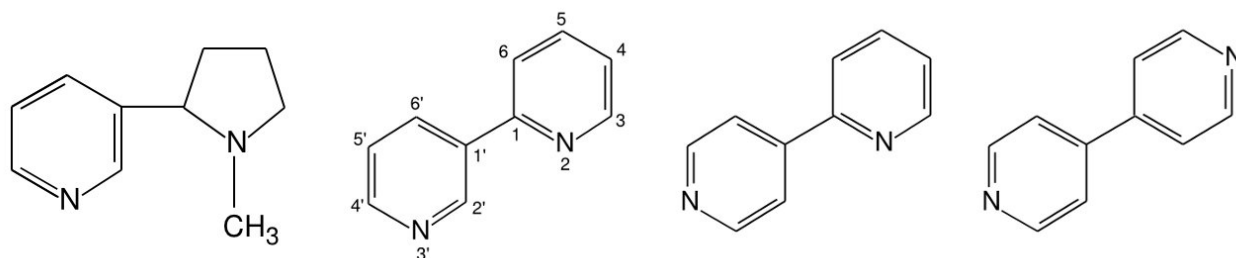
Zasadniczą część zanieczyszczeń chemicznych obecnych w środowisku to związki organiczne. Zarówno w przypadku oceny zdolności danej substancji do gromadzenia się w tkankach organizmów żywych, jak i podczas określania zawartości związku w określonym komponencie środowiska, należy brać pod uwagę fizykochemiczne cechy badanej substancji. Rutynowo stosowane procedury analityczne obejmują różne metody ekstrakcji analizowanych związków zarówno metodami klasycznymi (ekstrakcja ciecz – ciecz, ciecz – ciało stałe), jak i przy użyciu metod instrumentalnych, oferujących pracę w wysokiej temperaturze i w warunkach podwyższonego ciśnienia (np. ASE – *accelerated solvent extraction*). Dodatkowo, częstym etapem procedury jest wzbogacanie próbki, obejmujące np. zastosowanie ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Ze względu na fakt, iż znaczna część związków organicznych to substancje o charakterze lipofilowym, rutynowo etap ekstrakcji ogranicza się do zastosowania wybranego niepolarnego rozpuszczalnika organicznego przy założeniu, że wydajność ekstrakcji jest wysoka ze względu na znaczne powinowactwo analizowanych związków do fazy organicznej. Nieco inaczej sytuacja przedstawia się, gdy mamy do czynienia ze związkami, których właściwości kwasowo – zasadowe determinują formę, w jakiej są one obecne w środowisku. Substancje wykazujące charakter kwasowy będą obecne w środowisku w formie wolnego związku i/lub w formie zjonizowanej, jako aniony odpowiednich soli. W przypadku związków o charakterze zasadowym możliwe jest występowanie analitu w postaci wolnej oraz w postaci kationu odpowiedniej soli. Przewaga jednej formy nad drugą będzie zależna od pH środowiska. Wolne związki są w przeważającej większości bardziej lipofilowe, podczas gdy formy zjonizowane – hydrofilowe. Formą bardziej dostępną dla organizmów, łatwiej wchłanianą i chętniej gromadzącą się w tkankach będzie w takim przypadku substancja niezjonizowana. Zmiana pH może wtedy wywoływać znaczne różnice w przyswajalności jednej substancji chemicznej, a co za tym idzie, silnie wpływać na ewentualne efekty toksyczne, związane z narażeniem na obecność związku w środowisku. Jednocześnie, w przypadku analizy substancji o takich właściwościach, dobranie odpowiednich warunków ekstrakcji, zapewniających wyizolowanie związku w obu formach, jest w takiej sytuacji warunkiem uzyskania wiarygodnych wyników analiz ilościowych. Podstawy teoretyczne, dotyczące współczynnika podziału *n*-oktanol/woda i metod jego wyznaczania, zostały opisane w instrukcji do ćwiczenia 1 ("Wyznaczanie współczynnika podziału *n*-oktanol/woda dla kwasu octowego").

W niniejszym ćwiczeniu jako substancja modelowa zostanie zastosowana nikotyna. Wybór ten jest podyktowany faktem, iż znaczna liczba zanieczyszczeń środowiska wykazuje podobne

właściwości kwasowo-zasadowe, a co za tym idzie, zachowuje się w zbliżony sposób podczas zmian warunków środowiska. Dotyczy to m. in. związków aminowych, a także znacznej liczby farmaceutyków i pestycydów, posiadających w swej budowie np. heterocykliczny atom azotu. Dodatkowo, interesującą właściwością nikotyny jest jej rozpuszczalność (w formie wolnej) zarówno w wodzie, jak i w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych.

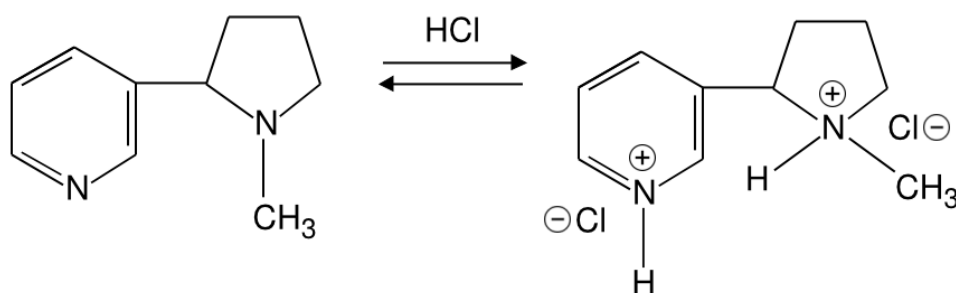
Nikotyna jest alkaloidem pochodzenia roślinnego, występującym w znacznej ilości głównie w roślinach z rodzaju *Nicotiana* (np. tytoń szlachetny *N. tabacum*, tytoń bakun *N. rustica*). Struktury nikotyny oraz związków, często stosowanych jako wzorce w jej analizie, zostały przedstawione na Rysunku 1. Poza zastosowaniem jako używka, nikotyna bywa wykorzystywana jako substancja aktywna bądź dodatek do komercyjnie dostępnych insektycydów (zwykle w postaci wolnej zasady lub wodnego roztworu siarczanu nikotyny). Mechanizm owadobójczego działania nikotyny polega na naśladowaniu **acetylocholin**y – głównego neurotransmitera w systemie nerwowym owadów. Nikotyna wiąże się z tym samym receptorem, co acetylocholina, przy czym w odróżnieniu od neurotransmitera czyni to trwale, gdyż jest odporna na działanie esterazy acetylocholinowej, przerywającej działanie przekaźnika. W efekcie następuje bardzo silna stymulacja układu nerwowego, która prowadzi do drgawek, a następnie paraliżu i śmierci owada. Ze względu na identyczny mechanizm toksyczności nikotyny u człowieka i innych ssaków, użycie tego związku jako pestycydu ma ograniczony zasięg i wymaga znacznej ostrożności.

Zatrucie nikotyną jest możliwe w wyniku jej wchłonięcia przez układ oddechowy (nikotyna w formie wolnej zasady jest stosunkowo lotnym związkiem, toteż zatrucia tego typu zdarzały się głównie podczas używania pestycydów zawierających wolną nikotyne), przez skórę lub oczy (głównie przy stosowaniu pestycydów, także przy zbiorze tytoniu, lub w wyniku wypadku w laboratorium). Wchłanianie przez układ pokarmowy jest mało intensywne ze względu na niskie pH panujące w żołądku (przez co dominuje nikotyna w formie hydrofilowej soli).



Rysunek 1. Wzory strukturalne (od lewej): nikotyny, 2,3'-dipirydyłu, 2,4'-dipirydyłu oraz 4,4'-dipirydyłu.

Ze względu na właściwości kwasowo-zasadowe, nikotyna może występować zarówno w formie **wolnej zasady**, jak i **sol**i. Nikotyna w formie wolnej jest oleistą cieczą, rozpuszczalną wprawdzie zarówno w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych, jak i w wodzie, ale o zauważalnie lipofilowym charakterze ($\log P = 1,2$; można ją zatem zaklasyfikować jako substancję średnio lipofilową). Sole nikotyny są zwykle substancjami stałymi, dobrze rozpuszczalnymi w wodzie i nierozpuszczalnymi w większości związków organicznych. Forma, w jakiej występuje nikotyna, jest ściśle uzależniona od pH środowiska. W roztworach silnie zasadowych obecna jest wolna nikotyna, w kwaśnych zaś – jej odpowiednia sól (patrz Rysunek 2). Zależnie od warunków, protonowanie nikotyny może zachodzić zarówno na atomie azotu w pierścieniu pirydylowym, jak i pirolidylowym, przez co możliwe jest powstawanie soli zarówno 'pojedynczych', jak i 'podwójnych'. Zarówno wolna nikotyna, jak i jej sole są obecne przy pH zbliżonym do obojętnego, przy czym przeważa forma soli. Sytuacja odwrotna ma miejsce przy pH około 9. Obecność nikotyny w środowisku może wynikać z jej zastosowania jako pestycydu lub dodatku do pestycydu (zwykle w formie soli), a także z zanieczyszczenia w wyniku przerobu tytoniu lub niewłaściwej utylizacji roślin i produktów tytoniowych. Ze względu na niewielką trwałość, nie jest poważnym zagrożeniem w środowisku, zaś analizy ograniczają się do badania środowiska pracy (w przypadku, gdy w miejscu pracy dozwolone jest palenie tytoniu), próbek żywności oraz próbek medycznych w przypadku zatrucia tym związkiem. W niniejszym ćwiczeniu nikotyna jest wykorzystywana jako związek modelowy, służący do oszacowania, w jakim zakresie pH substancje o zbliżonej budowie będą najbardziej przyswajalne dla organizmów żywych. Jednocześnie, uzyskane wyniki mogą być przydatne do opracowania metodyki ekstrakcji i analizy związków o zbliżonym charakterze. Podobną procedurę, po jej dostosowaniu, można zastosować przy oznaczaniu niektórych pestycydów i farmaceutyków. Także zastosowanie związków heterocyklicznych (np. pochodnych pirydyny) w laboratoriach oraz syntezach na skalę przemysłową prowadzi do ich obecności w środowisku i rodzi konieczność ich oznaczania w próbkach o różnym charakterze.

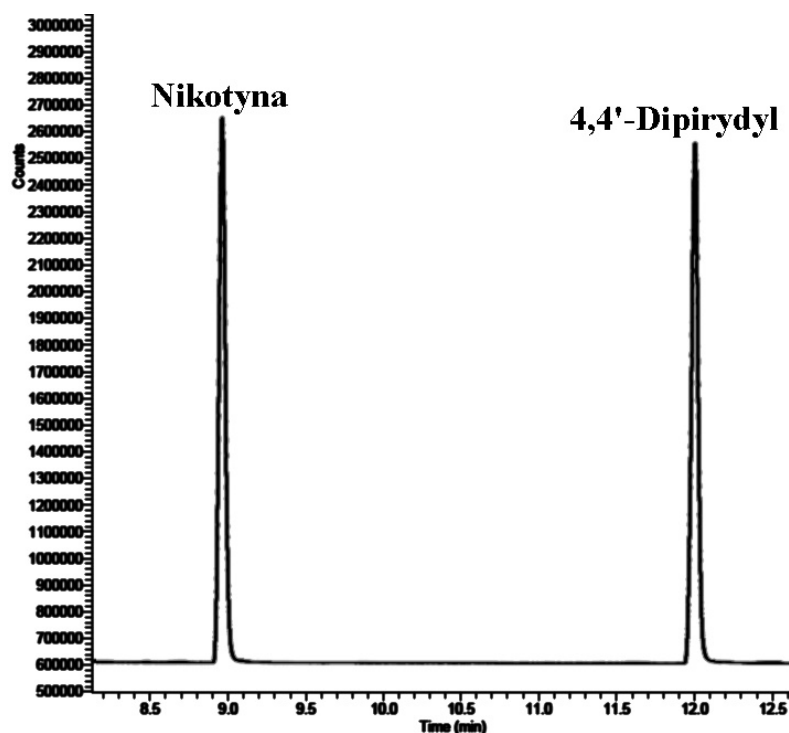


Rysunek 2. Schemat przedstawiający tworzenie się soli nikotyny w środowisku kwaśnym.

Możliwe są dwie strategie ekstrakcji nikotyny w celu analizy. Pierwszy sposób, gdy analizie można poddać roztwór wodny, polega zwykle na zastosowaniu rozcieńczonego roztworu kwasu, np. siarkowego (VI). Metoda ta jest przydatna, gdy analiza ma zostać wykonana np. techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), a w wyniku jej zastosowania otrzymujemy ekstrakt zawierający sole nikotyny. Jeśli bardziej odpowiedni jest roztwór w rozpuszczalniku organicznym (np. jak w niniejszym ćwiczeniu – przy zastosowaniu chromatografii gazowej GLC), stosuje się ekstrakcję w dwóch niemieszających się fazach, z których jedna jest roztworem wodnym o odczynie silnie zasadowym (np. wodorotlenku sodu, roztwór amoniaku), druga zaś – rozpuszczalnikiem organicznym (chloroform, chlorek metylenu, eter dietylowy, itd.). Dobrze rozpuszczalne w wodzie sole alkaloidów przechodzą do warstwy wodnej, gdzie – ze względu na pH środowiska, ulegają przekształceniu do wolnych zasad. Te z kolei, ze względu na znaczną lipofilowość, ulegają ekstrakcji do warstwy organicznej, która po osuszeniu może zostać poddana analizie. Związki o właściwościach zbliżonych do nikotyny, jeśli znajdują się w glebie lub w wodach powierzchniowych, będą ulegały przekształceniu do odpowiednich soli, jeśli tylko odczyn danego komponentu środowiska będzie kwaśny (co często jest spotykane). W takim przypadku, ekstrakcja przy zastosowaniu tylko rozpuszczalnika organicznego wyizoluje jedynie tę część substancji, która występuje w formie wolnej. Układ chlorek metylenu – woda gorzej niż oktanol – woda odwzorowuje naturalne bariery biologiczne, jednak ze względu na stosowaną metodę analityczną chlorek metylenu jest bardziej odpowiednim rozpuszczalnikiem.

Stosowaną w niniejszym ćwiczeniu techniką analizy nikotyny jest chromatografia gazowa, nie będą zatem omawiane przykłady zastosowania innych technik analitycznych (szczególnie przydatna jest także metoda HPLC). Warunki rutynowych analiz nie odbiegają znacznie od stosowanych powszechnie w przypadku związków organicznych. Stosuje się zwykle kolumny niepolarne (typu DB-1, DB-5) oraz średnio polarne (np DB-1701), przy czym, ze względu na stosunkowo polarny charakter analitu, na kolumnach o większej polarności można uzyskać nieco lepsze rezultaty. Zależnie od stężenia związku w matrycy, stosowany jest detektor uniwersalny (zazwyczaj płomieniowo-jonizacyjny FID) lub selektywny detektor azotowo-fosforowy (NPD), wykazujący większą czułość na związki azotu i fosforu niż detektor FID. Nikotyna jest związkiem dość lotnym, w związku z czym stosuje się zwykle temperatury analiz w granicach od 80 do 250°C. Analizę ilościową zwykle przeprowadza się metodą wzorca wewnętrznego (patrz następny rozdział), co rodzi konieczność dobrania związku o zbliżonych właściwościach. Dodatkowo, jeśli stosujemy detektor płomieniowo-jonizacyjny, wskazane jest, aby współczynnik odpowiedzi nikotyny względem wzorca był możliwie zbliżony do jedności. Struktury proponowanych wzorców

zostały przedstawione na Rysunku 1, natomiast na Rysunku 3 przedstawiono chromatogram uzyskany podczas analizy roztworu zawierającego równe ilości nikotyny oraz 4,4'-dipirydyłu. Związek ten ma zbliżone do nikotyny właściwości, a współczynnik odpowiedzi nikotyny wobec tej substancji wynosi w przybliżeniu 1 ($\pm 5\%$, co odpowiada w zasadzie błędowi analizy). Z tego względu, 4,4'-dipirydył zostanie zastosowany jako wzorzec w niniejszym ćwiczeniu.



Rysunek 3. Chromatogram gazowy mieszanki zawierającej równe ilości nikotyny i 4,4'-dipirydyłu.

Detektor FID nie reaguje jednakowo na takie same masy różnych substancji. Aby otrzymane wyniki analiz ilościowych odpowiadały rzeczywistości, wprowadza się **współczynniki odpowiedzi (korekcyjne) f** . Współczynnik korekcyjny jest liczbą, przez którą należy pomnożyć powierzchnię piku, aby uzyskać wartość wprost proporcjonalną do masy związku. Wartości te ustala się wobec głównego składnika próbki lub stosowanego wzorca (dla tego związku przyjmujemy $f = 1$). W takim przypadku:

$$\frac{m_S}{m_W} = f \frac{Y_S}{Y_W} \quad (1)$$

Stąd:

$$f = \frac{m_S Y_W}{m_W Y_S} \quad (2)$$

gdzie: m_S i m_W oznaczają masę substancji badanej i wzorca, f – współczynnik odpowiedzi substancji, Y_S i Y_W – powierzchnie lub wysokości pików substancji i wzorca.

Różnice we wskazaniach detektora FID dla różnych substancji można zaobserwować, analizując roztwór zawierający równe masy tych substancji.

Metoda wzorca wewnętrznego jest najbardziej rozpowszechnioną i dającą najbardziej wiarygodne wyniki metodą analizy ilościowej w chromatografii gazowej. Polega na dodaniu do próbki określonej ilości **wzorca wewnętrznego**, który **nie jest** jednym z analizowanych związków. Warunkiem zastosowania danej substancji jako wzorca jest uzyskanie rozdzielenia tej substancji i analitów podczas analizy chromatograficznej. Jeśli znamy współczynniki odpowiedzi badanych związków wobec wzorca, w celu obliczenia ilości analitów w próbce stosujemy wzór (1). Stąd, masa substancji oznaczanej jest równa:

$$m_S = f \frac{Y_S m_W}{Y_W} \quad (3)$$

Jeśli współczynniki odpowiedzi nie są znane, zwykle zakłada się, że wartość współczynnika wynosi 1 i wzór upraszcza się do postaci:

$$m_S = \frac{Y_S m_W}{Y_W} \quad (4)$$

2. WYKONANIE ĆWICZENIA

PROSZĘ ZACHOWAĆ OSTROŻNOŚĆ PODCZAS PRACY Z ROZTWORAMI NIKOTYNY (RĘKAWICZKI!). ZWIĄZEK W POSTACI WOLNEJ JEST SILNIE TRUJĄCY I WCHŁANIA SIĘ PRZEZ SKÓRĘ!

1. W probówkach miarowych 25 cm³ umieścić po 10 mL roztworów nikotyny o podanym pH, dodać po 10 mL chlorku metylenu, zatkać korkiem i wytrząsać przez 2-3 minuty, po czym odstawić do rozdzielenia faz.
2. Warstwę organiczną (dolną) przenieść za pomocą pipety Pasteura do kolby stożkowej na 50 mL, dodawać bezwodny siarczan sodu, aż przestanie się zbrylać, po czym przesączyć do kolby okrągłodennej na 50 mL, dodać 100 µL roztworu wzorca za pomocą strzykawki 100 µL, odparować na odparowywaczu obrotowym do objętości około 1 mL i przenieść do

zakręcaniej butelki o pojemności 2 mL.

3. Próbki analizować według wskazań prowadzącego zgodnie z następującymi warunkami:

- chromatograf gazowy GC-2010 (Shimadzu) z detektorem FID
- kolumna Zebron ZB-5 (Phenomenex) o długości 30 m, średnicy wewnętrznej 0,25 mm oraz grubości warstwy filmu fazy stacjonarnej 0,25 μm
- gaz nośny argon ze stałym przepływem 1,5 mL min⁻¹
- temperatura dozownika 250°C, dzielnik przepływu (splitter) 1:25
- temperatura detektora FID 250°C
- temperatura kolumny: 100°C-200°C z narostem temperatury 8°C min⁻¹

3. OPRACOWANIE WYNIKÓW

1. Na podstawie powierzchni sygnałów chromatograficznych nikotyny oraz wzorca obliczyć zawartość nikotyny w analizowanych próbkach, korzystając z wzoru (4).
2. Znając rzeczywistą zawartość nikotyny w próbkach wody, obliczyć całkowitą zawartość wolnej nikotyny dla każdej próbki i wykreślić zależność zawartości wolnej nikotyny (w % całkowitej ilości) od pH roztworu.
3. Na podstawie wyników ocenić, w jakim zakresie pH ekstrakcja pozwala wyizolować więcej niż 90% obecnej w wodzie nikotyny.
4. Krótko przedyskutować dostępność nikotyny dla organizmów wodnych w zależności od pH środowiska.

4. SZKŁO I ODCZYNNIKI

- chlorek metylenu destylowany, chlorek metylenu do mycia strzykawki, roztwór 4,4'-dipirydyli w chlorku metylenu (wzorec wewnętrzny, stężenie 1 mg mL⁻¹), bezwodny siarczan sodu
- wodne roztwory nikotyny (10 mg dm⁻³) o pH 6; 7; 8; 9; 10; 11
- probówka miarowa 25 mL z korkiem – 6 szt.
- kolba stożkowa 50 mL – 6 szt.
- kolba okrągłodenna 50 mL – 6 szt.
- lejek mały – 6 szt.
- cylinder miarowy 10 mL – 7 szt.
- butelki zakręcane 2 mL – 6 sztuk
- strzykawka 100 μL – 1 szt.

- strzykawka 10 μ L – 1 szt.
- sączi
- folia aluminiowa
- łyżka plastikowa – 1 szt.
- pipety Pasteura
- podkładki pod kolby okrągłodenne – 6 szt.
- ręczniki papierowe
- rękawiczki

5. ZAKRES WYMAGANYCH WIADOMOŚCI

- Podstawowe pojęcia z chromatografii gazowej (zawarte w niniejszej instrukcji oraz w instrukcji do przedmiotu **ANALIZA ŚLADOWYCH ZANIECZYSZCZEŃ W ŚRODOWISKU**, TEORIA: "Chromatografia gazowa", dostępna pod linkiem: http://chemia.ug.edu.pl/sites/default/files/_nodes/strona-chemia/17399/files/slady_gc.pdf)
- lipofilowość i współczynnik podziału
- kwasy i zasady, dysocjacja, stała dysocjacji kwasów i zasad, pH

6. LITERATURA

- Bielański A., *Chemia ogólna i nieorganiczna*, PWN, Warszawa 1976 (i nowsze wydania)
LUB: Bielański A., *Podstawy chemii nieorganicznej*, Tom I, PWN, Warszawa 2002.
- Mastalerz P., *Chemia organiczna*, PWN, Warszawa 1986 (i późniejsze wydania)
- Witkiewicz Z., Hetper J., *Chromatografia gazowa*, WNT, Warszawa 2001
- Alloway B.J., Ayres D.C., *Chemiczne podstawy zanieczyszczania środowiska*, PWN, Warszawa 1999