

Ćwiczenie 2:

WYZNACZANIE WSPÓŁCZYNNIKA PODZIAŁU *n*-oktanol/woda DLA WYBRANYCH CHEMICZNYCH ZANIECZYSZCZEŃ ŚRODOWISKA

(opracowanie: dr inż. Barbara Kułakowska-Skowronek)

Cel ćwiczenia

Chemiczne zanieczyszczenia uwalniane do środowiska ulegają rozdziałowi pomiędzy różne jego elementyżywione (świat zwierzęcy i roślinny) i nieożywione (powietrze, woda, gleba). Prognozowanie losów i migracji zanieczyszczeń w środowisku wymaga znajomości pewnych ich właściwości chemicznych. Jedną z takich właściwości związana jest z wartością współczynnika podziału oktanol-woda, powszechnie oznaczanego przez P_{ow} .

Celem tego ćwiczenia jest wyznaczenie wartości P_{ow} dla dwóch związków – acetofenonu i trichloroetenu (skrót: TCE, Tri). Otrzymane wartości zostaną porównane z odpowiednimi danymi literaturowymi.

WPROWADZENIE

Charakterystyka badanych związków.

Acetofenon jest najprostszym ketonem alifatyczno-aromatycznym. Jest stosowany w przemyśle perfumeryjnym jako środek zapachowy mydeł, detergentów, kremów, perfum. Ponadto jest substratem do otrzymywania wielu związków organicznych, znajduje zastosowanie jako katalizator w procesie polimeryzacji olefin, w syntezie organicznej jako fotouczulacz, rozpuszczalnik dla żywic, estrów celulozy i plastifikatorów, a także dodatek do lodów, puddingów, gum do żucia i żelatyny. Był stosowany jako środek nasenny pod nazwą hypnon. Acetofenon działa depresyjnie na ośrodkowy układ nerwowy ludzi i zwierząt, a jego duże dawki mogą powodować śmierć z powodu niewydolności oddechowej.

Trichloroeten (Tri) należy do licznej grupy węglowodorów chlorowanych. Są to tzw. ciecze ciężkie ze względu na ich gęstość większą od wody. Związki te ze względu na swoje specyficzne właściwości fizykochemiczne stanowią uciążliwe zanieczyszczenie, które np. dyskwalifikuje przydatność wód do spożycia. Tri wykorzystywany jest przy ekstrakcji tłuszczów z nasion, czyszczeniu i odtłuszczaniu metali, w przemyśle gumowym, farb, lakierów i atramentów drukarskich. Pary trichloroetenu drażnią błony śluzowe nosa i gardła, powodują podrażnienia skóry i oczu, działają negatywnie na czynności ośrodkowego układu nerwowego.

Wzory strukturalne obu związków przedstawiono na Rysunku 1, zamieszczonym poniżej.



Rysunek 1. Wzory strukturalne związków stosowanych w ćwiczeniu; (a) acetofenon – C_8H_8O ; (b) trichloroeten – C_2HCl_3 .

Współczynnik podziału, lipofilowość – definicje i znaczenie

Woda i n-oktanol to dwie niemieszające się ciecze. Acetofenon i Tri to substancje rozpuszczalne zarówno w wodzie jak i w n-oktanolu. Wprowadzenie acetofenonu czy Tri do jednej z tych dwóch niemieszających się cieczy rozpocznie proces ich przenoszenia przez granicę faz woda/n-oktanol i rozdział pomiędzy te fazy. Proces wędrówki przez granicę faz zakończy się w momencie ustalenia się równowagi termodynamicznej. W określonej temperaturze stosunek stężeń molowych (a dokładniej – aktywności) tej substancji w obu fazach osiągnie wielkością stałą. Jest to podane przez Nernsta tzw. *prawo podziału* [1]. Oznaczając przez c_i^{org} oraz c_i^w stężenia substancji rozpuszczonej w fazach organicznej oraz wodnej, można zapisać:

$$P = \frac{c_i^{org}}{c_i^w} = const \quad (1)$$

Stała **P** nosi nazwę **współczynnika podziału**.

Wartość współczynnika podziału

- zależy od rodzaju składników układu (cieczy i substancji rozpuszczonej) oraz od temperatury i ciśnienia, czyli jest cechą charakterystyczną dla danego układu dwóch rozpuszczalników i jednej substancji rozpuszczonej,
- nie zależy natomiast od ilości (masy, stężenia, objętości) składników układu.

Prawo podziału Nernsta jest słuszne, gdy

- ciecze nie mieszają się ze sobą (lub mieszają się ograniczenie),
- roztwory są rozcieńczone (stężenie $c \approx$ aktywność),
- temperatura jest stała,
- w żadnej z faz nie zachodzą procesy dysocjacji i asocjacji, czyli substancja występuje w takiej samej formie w obu fazach.

Prawo Nernsta można stosować tylko w przypadku substancji czystej rozdzielonej między dwa czyste rozpuszczalniki. Wszelkie zanieczyszczenia mogą wpływać na wartość współczynnika podziału.

Wynikający z prawa podziału Nernsta współczynnik podziału **P** danej substancji pomiędzy fazami organiczną i wodną jest najczęściej używanym parametrem lipofilowości substancji. Terminem **lipofilowość** nazywa się powinowactwo cząsteczki do fazy organicznej, czyli preferowanie przez cząsteczkę tej fazy nad fazę wodną. Lipofilowość jest niezwykle ważnym parametrem charakteryzującym substancje czynne biologicznie jakimi są lekarstwa, trucizny, kosmetyki, używki, środki ochrony roślin, konserwanty będące w żywności czy inne ksenobiotyki (substancje chemiczne obce dla organizmów żywych, celowo produkowane przez nasze społeczeństwo).

Szczególnie użytecznym układem dla wyznaczania wartości współczynnika podziału różnych związków aktywnych biologicznie jest układ ekstrakcyjny *n*-oktanol/woda.

Prace badawcze prowadzone w tym temacie w ostatnich kilkudziesięciu latach dowodzą bowiem, że wyznaczana dla tego układu lipofilowość jest w dużym stopniu skorelowana z lipofilowością układów w ustroju biologicznym oraz środowisku naturalnym. Obecnie współczynnik podziału oktanol/woda (**P_{ow}**) jest jednym z podstawowych parametrów wyznaczanych dla nowo-syntetyzowanych substancji o znaczeniu biologicznym.

Lipofilowość jest najważniejszym czynnikiem determinującym zachowanie się substancji chemicznej *in vivo*. Bogate w lipidy błony komórkowe są łatwo penetrowane przez substancje lipofilowe, charakteryzujące się wysokim współczynnikiem podziału oktanol/woda. W konsekwencji, lipofilowość leku czy trucizny ma istotne znaczenie dla procesów jego dystrybucji w organizmie, szczególnie na szybkość jego przenikanie przez lipofilowe błony komórkowe i wchłaniania do krwiobiegu.

Lipofilowość jest także wykorzystywana do przewidywania efektywności działania związków czynnych w kosmetyce. Badanie współczynników podziału jest wstępnym etapem badania penetracji substancji w warstwę rogową naskórka. Obecnie wiadomo, że współczynnik podziału oktanol/woda jest parametrem decydującym o zdolności substancji chemicznej do penetracji w warstwę rogową naskórka. Badania dowodzą, że cząsteczki o zbalansowanym współczynniku oktanol – woda wnikają w głąb skóry najbardziej efektywnie [2, 3].

Jednym z najważniejszych zastosowań współczynnika podziału związku między n-oktanołem a wodą jest szacowanie zagrożeń wynikających z chemicznego zanieczyszczenia środowiska. Wartość współczynnika podziału oktanol/woda wyznaczona dla typowych zanieczyszczeń środowiska mieści się w bardzo szerokim zakresie, od 0,01 (związki hydrofilowe) do 10^{10} dla substancji lipofilowych.. Tak szeroki zakres zmienności wartości współczynnika spowodował, że przyjęto wyrażać go w formie logarytmicznej (**log P_{ow}**).

Substancja, która cechuje się wysoką lipofilnością, tzn. łatwo rozpuszcza się w tłuszczach, może być bardzo groźna dla środowiska. Substancje lipofilowe są bowiem łatwo absorbowane i osadzane na drobinach materii (zarówno żywej, jak i cząsteczkach substancji organicznych i nieorganicznych). Związki chemiczne, które są lipofilowe i zarazem lotne zwykle przemieszczają się z wody do atmosfery. Substancje lipofilowe mogą łatwo przenikać przez błony komórkowe i gromadzić się w organizmie, zwłaszcza w jego tkance tłuszczowej. Trwałe substancje o tych właściwościach akumulują się w tkankach tłuszczowych organizmów żywych. W miarę przemieszczania się w górę łańcucha pokarmowego, stężenia tych substancji mogą zwiększać się o współczynnik wynoszący wiele tysięcy lub milionów, a także mogą szkodzić ludziom i innym organizmom nawet w tych bardzo niskich stężeniach, w jakich występują one obecnie w środowisku, dzięki przyrodzie i u ludzi.

Powszechnie znanymi przykładami takich groźnych dla środowiska substancji, charakteryzujących się wysoką lipofilowością są DDT (azotox), związki PCB (polichlorowane dwufenyle) i dioksyny oraz furany. Do tej grupy substancji należą również niektóre metale ciężkie, które mogą tworzyć lipofilowe związki metaloorganiczne, jak np. rtęć.

Efekt oddziaływania związku chemicznego zależy od jego stężenia w środowisku i czasu działania. Aby ocenić narażenie środowiska na związki chemiczne, niezbędne jest ich ocena pod względem biokoncentracji (szerzej bioakumulacji). **Biokoncentracja** to wzrost stężenia związku chemicznego w organizmie wskutek absorpcji tkankowej, który zachodzi szybciej od procesu metabolizmu i wydalania. Biokoncentracja dotyczy tylko środowiska wodnego, gdy brane są pod uwagę inne przedziały środowiskowe, tj. powietrze i gleba oraz kontakt drogą pokarmową – mówi się wtedy o **bioakumulacji**. Zdolność do bioakumulacji wzrasta ze wzrostem rozpuszczalności w tłuszczach. Stąd też, sposobem szacowania ryzyka bioakumulacji przy kontakcie organizmów wodnych z substancją chemiczną jest pomiar współczynnika biokoncentracji (BCF – Bioconcentration Factor) lub współczynnika bioakumulacji (BAF – Bioaccumulation Factor). Istnieje wiele metod oznaczania BCF lub BAF, jednakże są one drogie, ponieważ wymagają zmierzenia metabolizmu organizmu. Dużo prostszą metodą jest oznaczenie chemiczne (lub obliczenie na podstawie struktury chemicznej związku) współczynnika podziału n-oktanol/woda. N-oktanol w tym oznaczeniu modeluje tkankę tłuszczową (lipidową). Związki o większej rozpuszczalności w n-oktanolu niż w wodzie wykazują większą skłonność do akumulacji w tkance lipidowej organizmów wodnych. Log P_{ow} jest powszechnie stosowanym kryterium biokoncentracji (bioakumulacji). Jego wartość jest bardzo często podawana w karcie charakterystyki produktu.

Produkt charakteryzuje niski potencjał do bioakumulacji, gdy Log P_{ow} <3. Produkt charakteryzuje wysoki potencjał do bioakumulacji, gdy Log P_{ow} >3.

Tradycyjnie współczynnik podziału wyznacza się stosując ekstrakcję w układzie n-oktanol/woda (metoda wytrząsania w kolbie) bądź wyznacza się metodami pośrednimi, z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) lub metodami obliczeniowymi.

WYKONANIE ĆWICZENIA

Metodyka wyznaczania współczynnika podziału stosując ekstrakcję w układzie n-oktanol/woda.

Aby wyznaczyć współczynnik podziału dla danego związku chemicznego, należy doprowadzić do stanu równowagi między składnikami układu oktanol/związek/woda po czym oznaczyć stężenia badanego związku w obydwu rozpuszczalnikach. Oznaczenie należy wykonać przez pobranie z naczynia badawczego próbki każdej fazy i oznaczenie substancji wybraną metodą, specyficzną dla badanego związku.

W tym ćwiczeniu należy wykonać oznaczenie stężenia acetofenonu i trichloroetenu w fazie wodnej, stosując metodę spektrofotometryczną w oparciu o krzywą wzorcową. Stężenia tych związków w fazie organicznej należy obliczyć z bilansu liczności substancji rozpuszczonej w fazie wodnej przed wytrząsaniem z cieczą organiczną ($V^w \cdot c_i^{pocz.}$) oraz po ustaleniu się stanu równowagi, tzn.

$$V^w c_i^w + V^{org} c_i^{org} = V^w c_i^{pocz} \quad (2)$$

Gdzie V^w , V^{org} oznaczają odpowiednio objętości fazy wodnej i organicznej a c^w i c^{org} – stężenia molowe danej substancji w fazie wodnej i organicznej.

W celu zapewnienia dokładności wyznaczenia współczynnika podziału, badania należy powtarzać wykonując je w kilku różnych wariantach, stosując różne ilości badanej substancji i różne proporcje objętości rozpuszczalników.

Sprzęt i odczynniki

Spektrofotometr UV-VIS. Kuwety kwarcowe.

Szkło laboratoryjne:

rozdzielacze o pojemności 100 cm³ - 12 sztuk (minimum)

kolby miarowe na 50,00 cm³ - 30 sztuk,

mikropipety na 50 µl i 100 µl,

pipety: na 1 cm³, 5 cm³, 10 cm³, 25 cm³,

cylinder miarowy na 50,00 cm³ - 4 sztuki,

zlewki o pojemności 50 cm³ - 8 sztuk,

Rękawice ochronne jednorazowe; ręcznik papierowy.

Odczynniki:

oktanol

metanol do mycia kuwet,

roztwór acetofenonu o stężeniu 500 mg/dm³ w wodzie,

roztwór Tri o stężeniu 1460 mg/dm³ w 1% metanolu.

Wykonanie oznaczeń

1. Sporządzić serię wodnych roztworów acetofenonu i Tri do wyznaczenia zależności absorpcji tych roztworów od stężenia acetofenonu czy TRI, korzystając z prawa Lamberta-Beera

$$A = \varepsilon \cdot d \cdot c \quad (3)$$

gdzie ε jest molowym współczynnikiem absorpcji mający wymiar [dm³·mol⁻¹·cm⁻¹],

d jest długością drogi optycznej w cm,

a c jest stężeniem substancji absorbującej w [mol·dm⁻³].

W celu przygotowania roztworów służących do wyznaczenia krzywej wzorcowej dla acetofenonu, należy przygotować 6 wodnych roztworów acetofenonu o różnych stężeniach w zakresie od 1,0 mg/dm³ do 30,0 mg/dm³, zgodnie z Tabelą 1. Roztwór podstawowy (wyjściowy) acetofenonu ma stężenie 500 mg/dm³.

W celu wyznaczenia krzywej wzorcowej dla Tri, należy przygotować 5 wodnych roztworów Tri o różnych stężeniach w zakresie od ok. 15 mg/dm³ do ok. 300 mg/dm³ (patrz Tabela 2). Roztwór podstawowy to Tri rozpuszczona w wodzie dejonizowanej (1% r-r etanolu) do stężenia 1460 mg/dm³.

Roztwory należy przygotować w kolbach miarowych o pojemności 50,00 cm³. Po odmierzeniu odpowiedniej ilości roztworów podstawowych i ich rozcieńczeniu do 50,00 cm³, kolby należy zamknąć korkami, roztwory dobrze wymieszać i pozostawić na około 15 minut.

2. Zmierzyć absorbancję roztworów acetofenonu przy długości fali **246 nm**, a absorbancję roztworów Tri - przy długości fali **230 nm**. Wszystkie pomiary wykonywać względem wody destylowanej. Wyniki zanotować w Tabelach 1 i 2, odpowiednio.

Kuwety przed zmianą roztworu i po zakończeniu pomiarów należy myć wodą destylowaną i metanolem a następnie wysuszyć strumieniem chłodnego powietrza. Roztwory użyte do pomiarów i popłuczyny po myciu kuwet należy zlewać do specjalnych pojemników (NIE wylewać do zlewu !)

3. Przygotować roztwory do właściwych pomiarów współczynnika podziału. W tym celu do czterech rozdzielaczy na 100 cm³ należy przenieść odpowiednie ilości roztworów podstawowych acetofenonu lub Tri a następnie n-oktanolu (w takiej kolejności), zgodnie z danymi zawartymi w Tabelach 3 i 4. Rozdzielacze zamknąć szczelnie korkiem i wytrząsać delikatnie (patrz rys. 2), odpowietrzając kilkakrotnie przez ostrożne, powolne uchylenie korka. Kiedy ciśnienie w kolbie się ustali, można wytrząsać bardziej energicznie. Sposobem zalecanym jest szybkie obracanie rozdzielacza o 180° wokół jego poprzecznej osi tak, aby powietrze nie przechodziło przez obydwie fazy.



Rysunek 2. Położenie rozdzielacza podczas wytrząsania.

Zalecane jest wykonanie 100 obrotów w czasie ok. 5 minut.

Podczas wytrząsania, szczególnie w doświadczeniu z Tri, może powstać emulsja, co uniemożliwia dokładne rozdzielenie warstw. Aby temu zapobiec należy na początku wykonywać ostrożny ruch wirowy lub kołowy kolby przy mieszaniu zawartości rozdzielacza i dopiero przy końcu ekstrakcji należy wstrząsać rozdzielaczem bardziej energicznie.

Następnie rozdzielacze odstawić do statywu, aby ciecze się rozwarstwiły i sklarowały. Górną warstwę stanowi roztwór acetofenonu (Tri) w oktanolu, natomiast dolną – wodny roztwór tej substancji.

4. Oznaczyć stężenie acetofenonu i Tri w wodnym roztworze po rozdzieleniu. W tym celu należy wyjąć korki z rozdzielaczy, postawić pod rozdzielacze zlewki i wypuścić do zlewek około 10 cm³ warstwy wodnej. Ze zlewek pobrać próbki do pomiarów absorbancji. Uzyskane wyniki zanotować w tabelach 3 i 4.

Opracowanie wyników

1. Korzystając z dowolnego programu komputerowego sporządzić wykresy zależności absorbancji wodnych roztworów acetofenonu i Tri od ich stężenia (krzywe wzorcowe) i przybliżyć je linią prostą typu $y=a \cdot x$ (prosta ma przechodzić przez początek układu współrzędnych !). Wyznaczyć

wartości współczynnika kierunkowego odpowiednich prostych a także wartości współczynnika korelacji R^2 .

2. Na podstawie równań krzywych wzorcowych, wyznaczyć stężenia acetofenonu i Tri w wodnych roztworach po wytrząsaniu z oktanołem. Wartości wpisać do Tabel 3 i 4.

3. Obliczyć stężenia acetofenonu i Tri w rozpuszczalniku organicznym, korzystając ze wzoru (2). Wartości wpisać do Tabel 3 i 4.

4. Sporządzić wykres zależności $c^{org}=f(c^w)$. Zależność aproksymować linią prostą **przechodzącą przez początek układu współrzędnych**. Współczynnik kierunkowy prostej podaje szukaną wartość współczynnika podziału (wartość P wyznaczona graficznie).

5. Obliczyć współczynnik podziału n-oktanol/woda badanych związków dla poszczególnych mieszanin ekstrakcyjnych na podstawie danych zebranych w Tabelach 3 i 4 i wpisać te wartości w ostatniej kolumnie tych tabel.

Przeprowadzić statystyczną ocenę otrzymanych wyników obliczając:

średnią wartość, rozstęp, odchylenie standardowe pojedynczego wyniku.

Wyniki zestawzić w Tabeli 5 (zamieszczają Studenci).

6. Jako metodę walidacji otrzymanych rezultatów, wykorzystać zależność, którą otrzymuje się przez podstawienie $c^{org} = P \cdot c^w$ do równania bilansowego (2), tzn.:

$$c^{pocz} / c^w = (V^{org} / V^w) P + 1 \quad (4)$$

Sporządzić odpowiednie wykresy zależności stosunku stężeń od stosunku objętości, zgodnie z równaniem (4), a następnie wyznaczyć współczynniki kierunkowe prostych przybliżających te zależności (równanie typu $y=ax+1$), czyli znaleźć wartości P (wartość P wyznaczona graficznie z równania (4)).

7. Porównać wyniki, w postaci **log P**, wyznaczone graficznie (pkt 4 i 6)

8. Wyszukać co najmniej jedną wartość literaturową (cytować pracę w sprawozdaniu) dla wyznaczanych wielkości i porównać wyniki swoich oznaczeń z wartościami literaturowymi **log P**.

9. Biorąc pod uwagę wartości **log P**, skomentować możliwe zagrożenia dla środowiska ze strony acetofenonu i trichloroetenu.

Tabela 1. Dane do krzywej wzorcowej dla acetofenonu

Nr próbki	Objętość roztworu (w cm^3) acetofenonu o stężeniu 500 mg/dm^3	Rozcieńczenie do objętości końcowej próbki [cm^3]	Stężenie acetofenon w otrzymanej próbce [mg/dm^3]	Zmierzona absorbancja
1		50,00	1,0	
2		50,00	5,0	
3		50,00	10,0	
4		50,00	15,0	
5		50,00	20,0	
6		50,00	30,0	

Tabela 2. Dane do krzywej wzorcowej dla trichloroetenu

Nr próbki	Objętość roztworu (w cm ³) Tri o stężeniu 1460 mg/dm³	Rozcieńczenie do objętości końcowej próbki [cm ³]	Stężenie Tri w otrzymanej próbce [mg/dm ³]	Zmierzona absorbanca
1	0,5	50,00		
2	1	50,00		
3	2	50,00		
4	5	50,00		
5	10	50,00		

Tabela 3. Dane dotyczące ekstrakcji acetofenonu

Objętość roztworu acetofenonu o stężeniu 500 mg/dm³	Objętość oktanolu użytego do ekstrakcji [cm ³]	Absorbancja fazy wodnej po ekstrakcji	Stężenie w fazie wodnej po ekstrakcji, c ^w [mg/dm ³]	Stężenie w oktanolu po ekstrakcji, c ^{org} [mg/dm ³]	Wartość P=c^{org}/c^w
40,0 cm ³	20,0				
30,0 cm ³	25,0				
20,0 cm ³	30,0				
10,0 cm ³	35,0				

Tabela 4. Dane dotyczące ekstrakcji Tri

Objętość roztworu Tri o stężeniu 1460 [mg/dm³]	objętość oktanolu użytego do ekstrakcji [cm ³]	Absorbancja fazy wodnej po ekstrakcji	Stężenie w fazie wodnej po ekstrakcji, c ^w [mg/dm ³]	Stężenie w oktanolu po ekstrakcji, c ^{org} [mg/dm ³]	Wartość P=c^{org}/c^w
95,0 cm ³	5,0				
90,0 cm ³	10,0				
85,0 cm ³	15,0				
75,0 cm ³	25,0				

LITERATURA

- [1] Pigoń K., Ruziewicz Z., *Chemia fizyczna*, tom 1 wyd. 6, PWN, Warszawa 2007
- [2] Starzyk E., Arct J., *Lipofilowość i absorpcja przeznaskórkowa w kosmetyce*, Wiadomości PTK, 6(3) 12-17, 2003
- [3] Arct J., Chełkowska M., *Czy możliwe jest przewidywanie zdolności wnikania w skórę aktywnych składników produktów kosmetycznych?* Wiadomości PTK 4(3/4) 37- 42, 2001

Zakres zagadnień obowiązujących do ćwiczenia

1. Prawo podziału Nernsta. Zależność współczynnika podziału od parametrów fizykochemicznych.
2. Praktyczne zastosowania współczynnika podziału *n*-oktanol/woda.
4. Pojęcia: lipofilowość, bioakumulacja. Związek między tymi parametrami a współczynnikiem podziału *n*-oktanol/woda.
5. Zagrożenia dla środowiska ze strony substancji wykazującej wysoką lipofilowość.
6. Metodyka oznaczania współczynnika podziału.
7. Podstawy spektrofotometrii Uv-vis. Stosowana aparatura. Elementy typowego spektrofotometru.