

Ćwiczenie nr B4

BADANIE WŁAŚCIWOŚCI LIPOFILOWYCH WYBRANYCH PESTYCYDÓW TECHNIKĄ CHROMATOGRAFII PLANARNEJ

I. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zbadanie właściwości lipofilowych pestycydów techniką chromatografii planarnej

II. Zagadnienia wprowadzające

1. Podstawy chromatografii.
2. Podstawowe wiadomości o lipofilowości.

Literatura obowiązuująca:

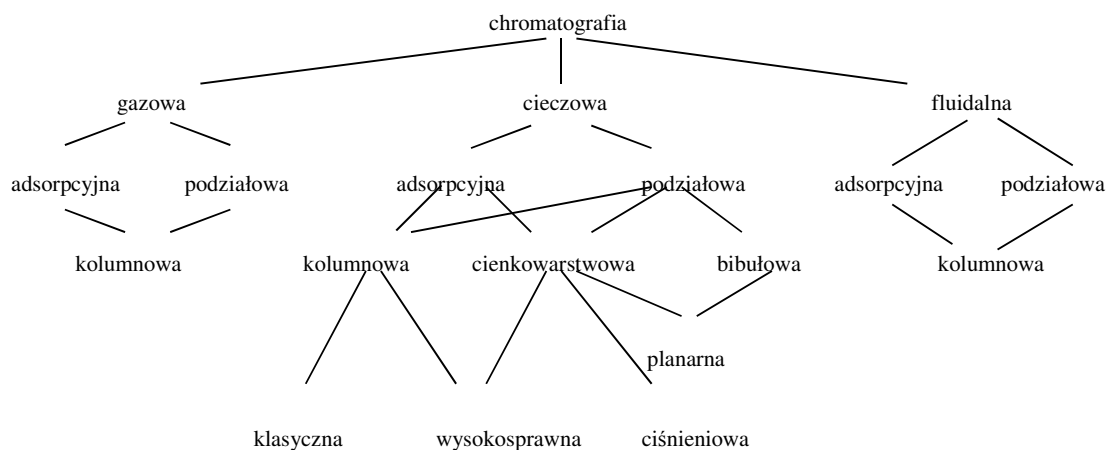
1. Zygfryd Witkiewicz, *Podstawy chromatografii*, WNT, 1992
2. Praca zbiorowa, *Chemia fizyczna*, PWN, 2001.

III. Część teoretyczna

III.1. Podstawy chromatografii

Chromatografia to obecnie jedna z najbardziej rozpowszechnionych metod instrumentalnych w analizie chemicznej. Umożliwia wykrycie i oznaczenie ilości substancji zawartej w próbce, w obecności wielu innych składników. Jest to technika analityczna stosowana w przemyśle, rolnictwie, ochronie środowiska oraz w medycynie i farmacji. Choć chromatografia jest przede wszystkim techniką analityczną wykorzystywana jest także w badaniach fizyko-chemicznych. W sposób chromatograficzny badane są adsorbenty i procesy adsorpcji, katalizatory oraz właściwości fizykochemiczne i biologiczne substancji organicznych.

Chromatografia to technika analityczna, która wykorzystuje różnice powinowactwa rozdzielanych substancji do fazy stacjonarnej (nieruchomej) i ruchomej, czyli różny podział poszczególnych składników mieszaniny między te fazy. Fazą ruchomą może być gaz, ciecz lub fluid, czyli substancja w stanie nadkrytycznym (stan pośredni między cieczą i gazem). Stan skupienia fazy ruchomej jest podstawowym kryterium podziału metod chromatograficznych, zgodnie z którym wyróżniamy chromatografię gazową, cieczową i fluidalną. Stan skupienia fazy stacjonarnej jest podstawowym kryterium podziału metod chromatograficznych, zgodnie z którym wyróżniamy chromatografię kolumnową i planarną (cienkowarstwową). W zależności od tego czy faza stacjonarna umieszczona jest w kolumnie czy też na płaszczyźnie, mamy do czynienia z chromatografią kolumnową lub planarną (cienkowarstwową). Uproszczoną klasyfikację technik chromatograficznych przedstawia poniższy schemat:



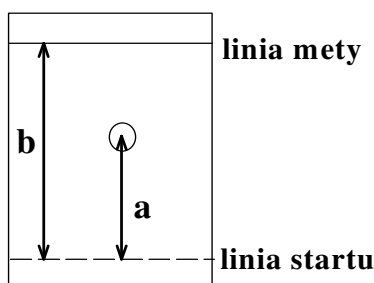
Rysunek. 1 Podział technik chromatograficznych.

Podstawowym parametrem chromatograficznym jest współczynnik retencji k , który jest ilościową miarą procesu podziału chromatografowanej substancji między fazę stacjonarną i ruchomą. Współczynnik ten zdefiniowany jest jako stosunek ilości (np. liczby moli)

substancji chromatografowanej w fazie stacjonarnej do jej ilości w fazie ruchomej. Wartość k jest w danej temperaturze i dla danego układu chromatograficznego, tj. fazy stacjonarnej i ruchomej, charakterystyczna dla analizowanej substancji.

W chromatografii cienkowarstwowej podstawowym parametrem retencyjnym jest R_F , czyli współczynnik retardacji (opóźnienia). Jego wartość można obliczyć wprost z chromatogramu (rysunek 2) zgodnie ze wzorem:

$$R_F = \frac{a}{b} = \frac{\text{środek plamki}}{\text{czoło fazy ruchomej}} \quad (1)$$



Rys. 2. Płytki chromatograficznej po rozwinięciu.

Współczynniki retencji k i R_F wiąże następująca zależność:

$$k = \frac{1 - R_F}{R_F} \quad (2)$$

lub

$$\log k = \log \frac{1 - R_F}{R_F} = R_M \quad (3)$$

Parametr R_M występujący w równaniu 3 to najczęściej stosowany w chromatografii cienkowarstwowej parametr retencyjny. W zależności od układu chromatograficznego parametr R_F może osiągać wartości zawarte w przedziale od 0 do 1. Substancja nie migrująca w danym układzie osiąga wartość $R_F = 0$ (zostaje na linii startu). Jeżeli substancja wędruje z czołem fazy ruchomej to odpowiadająca jej wartość $R_F = 1$.

III.2. Pojęcie lipofilowości

Terminem lipofilowość określa się powinowactwo cząsteczki do fazy organicznej, czyli preferowanie przez cząsteczkę tej fazy nad fazę wodną. Często uważa się, że lipofilowość jest synonimem słowa hydrofobowość oznaczającego unikanie wody i niejednokrotnie oba pojęcia używane są zamiennie. Jednak zgodnie z założeniami IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), od 1996 roku odróżnia się pojęcie hydrofobowości od lipofilowości. Miarą lipofilowości jest dystrybucja substancji w układzie

dwufazowym. ciecz-ciecz, o której decydują oddziaływania międzycząsteczkowe występujące pomiędzy daną substancją i fazą niepolarną. Natomiast hydrofobowość jest skutkiem przyciągających oddziaływań między grupami niepolarnymi (pierścieniami, łańcuchami węglowodorowymi) cząsteczek danej substancji powodujących ich agregację w środowisku wodnym. Tak więc hydrofobowość jest integralnym elementem lipofilowości, która jest pojęciem bardziej ogólnym. Lipofilowość jest ważnym parametrem charakteryzującym substancje czynne biologicznie jakimi są leki czy środki ochrony roślin. Obecnie lipofilowość jest jednym z podstawowych parametrów wyznaczanych dla nowosyntezyowanych substancji o znaczeniu biologicznym.

Działanie substancji chemicznej (leku lub trucizny) na żywy organizm to szereg procesów biofizycznych i biochemicznych, które podzielić można na trzy fazy:

- **farmaceutyczną**, na którą składa się forma w jakiej przyjmowana substancja dociera do organizmu, sposób jej podania oraz uwalniania się w organizmie;
- **farmakokinetyczną**, czyli transport cząsteczek substancji w organizmie, ich metabolizm i eliminacja;
- **farmakodynamiczną**, czyli oddziaływanie cząsteczki substancji z farmakoreceptorem przynoszące pożądaną efekt farmaceutyczny.

Choć każdy z wymienionych etapów jest związany z charakterem lipofilowym substancji, to najistotniejszy wpływ wywiera ona na procesy dystrybucji leku w organizmie, czyli na fazę farmakokinetyczną. Szczególną uwagę należy zwrócić na zachowanie się danej substancji podczas przenikania przez lipofilowe błony komórkowe oddzielające środowiska wodne.

Lipofilowość jest opisywana przez procesy podziałowe między dwiema fazami: niepolarną (organiczną) i polarną (najczęściej wodną). Ilościową miarą takiego procesu jest współczynnik podziału P , czyli stosunek stężenia danej substancji w fazie organicznej (c_{org}) do jej stężenia w fazie wodnej (c_w), w stanie równowagi:

$$P = \frac{c_{org}}{c_w} \quad (4)$$

Od lat 60-tych układ ekstrakcyjny n-oktanol/woda jest tradycyjnie stosowany do badania właściwości lipofilowych różnych związków aktywnych biologicznie, a prace badawcze prowadzone w ciągu ostatnich kilkadziesiąt lat dowodzą, że wyznaczana dla tego układu lipofilowość jest silnie skorelowana z lipofilowością układów biologicznych. Obecnie powszechnie dostępne są doświadczalnie wyznaczone wartości $\log P$ dla tysięcy różnych substancji organicznych.

Tradycyjna metoda wyznaczania wartości $\log P$, to znaczy ekstrakcja w układzie n-oktanol/woda, jest bardzo pracochłonna i mało dokładna. Wymaga stosowania stosunkowo dużych ilości bardzo czystych substancji. Już niewielkie ilości zanieczyszczeń mogą drastycznie zmieniać wyniki pomiarów i prowadzić do błędnych wniosków. Konieczne jest także stosowanie bardzo czułych metod analizy ilościowej do oznaczania stężeń danej substancji w poszczególnych fazach. Mierzalny zakres $\log P$ wynosi od -3 do 3 ($P = 0,001-1000$). Dlatego też znaczenia nabierają pośrednie metody wyznaczania lipofilowości, wśród których najważniejsze są metody chromatograficzne.

Obecnie, poza metodami doświadczalnymi (bezpośrednimi i pośrednimi), do wyznaczania wartości $\log P$ stosowane są także metody obliczeniowe, które podzielić można na trzy grupy:

- **metody oparte na fragmentach cząsteczek** (określonym fragmentem, tzn. atomom lub grupom atomów, przyporządkowane są pewne doświadczalnie wyznaczone wartości, których suma stanowi całkowitą wartość $\log P$ cząsteczki);
- **metody atomowe** (każdy atom charakteryzuje pewna stała - wkład w lipofilowość cząsteczki, przy czym atomy tego samego typu, w zależności od konfiguracji, mają różne wartości stałych atomowych; sumowanie stałych atomowych prowadzi do wartości $\log P$ cząsteczki jako całości);
- **metody oparte na właściwościach całych cząsteczek** (na podstawie obliczonych kwantowo-mechanicznie energii solwatacji cząsteczki w fazie wodnej i organicznej wyznacza się wartość $\log P$).

Metody obliczeniowe dobrze sprawdzają się w przypadku substancji o niezbyt skomplikowanej strukturze i pozwalają uniknąć żmudnych badań doświadczalnych. Posiadają jednak znaczne ograniczenia i zawodzą w przypadku substancji izomerycznych lub zdolnych do tworzenia wewnętrznych wiązań wodorowych.

III.3. Chromatograficzne metody pomiaru lipofilowości

Choć chromatografia to przede wszystkim technika analizy ilościowej i jakościowej mieszanin, stosuje się ją także w innych dziedzinach nauki, zwłaszcza w badaniach fizykochemicznych. Podstawą tych badań jest fakt, że wynik chromatograficzny (współczynnik retencji) jest zależny od procesów fizykochemicznych decydujących o mechanizmie retencji. Między współczynnikiem podziału P w układzie ekstrakcyjnym a współczynnikiem retencji k w analogicznym układzie chromatograficznym istnieje następujący związek:

$$\log k = \log P + \log \frac{V_S}{V_M} \quad (5)$$

gdzie V_S i V_M to objętości fazy stacjonarnej i ruchomej w danym układzie chromatograficznym.

Do oceny właściwości lipofilowych substancji organicznych szczególnie przydatna jest chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz. Chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz wykorzystuje niepolarną fazę stacjonarną oraz polarną fazę ruchomą. W pomiarach lipofilowości fazą stacjonarną jest zwykle faza RP-18, w której z powierzchnią adsorbentu (żelu krzemionkowego) są chemicznie związane łańcuchy węglowodorowe ($-C_{18}H_{37}$). Fazy ruchome zawierają, oprócz wody, modyfikator organiczny, którym najczęściej jest metanol (stosowany może być także acetonitryl, aceton czy dioksan) a w przypadku badania substancji zdolnych do jonizacji także bufor o odpowiednim pH. W porównaniu z metodą ekstrakcyjną chromatograficzne metody oceny lipofilowości mają

wiele zalet. Przede wszystkim są znacznie mniej pracochłonne i umożliwiają jednoczesne wykonywanie wielu pomiarów. Nie jest konieczne stosowanie dużych ilości badanych substancji, jak też nie mają znaczenia ewentualne zanieczyszczenia, co jest szczególnie ważne w przypadku badania substancji naturalnych. Znacznie szerszy jest też zakres mierzonych doświadczalnie wartości lipofilowości i nie ma potrzeby wykonywania analiz ilościowych. Metody chromatograficzne są bardziej powtarzalne i pozwalają na standaryzację uzyskanych wyników przez wykonywanie pomiarów dla substancji wzorcowych. Uważa się także, że dynamiczny układ chromatograficzny zdecydowanie bardziej przybliży biologiczne układy podziałowe istniejące w żywych organizmach.

Mimo szeregu zalet, chromatograficzne metody pomiaru lipofilowości mają także ograniczenia. Standardowym parametrem lipofilowości, odpowiadającym układowi podziałowemu n-oktanol/woda, jest współczynnik retencji w czystej wodzie jako fazy ruchomej - k_w . Bezpośrednie zmierzenie tego parametru, przy zastosowaniu wody jako fazy ruchomej oraz związanej chemicznie fazy RP-18 jako fazy stacjonarnej, jest możliwe jedynie w przypadku substancji o umiarkowanej lipofilowości i to tylko w technikach wykorzystujących wymuszony przepływ fazy ruchomej, to znaczy w chromatografii kolumnowej lub planarnej wysokociśnieniowej. Klasyczna chromatografia cienkowarstwowa wykorzystująca jedynie siły kapilarne jest w tym przypadku nieprzydatna, albowiem czysta woda nie zwilża niepolarną fazę stacjonarną jaką jest wypełnienie typu RP-18. Jednak nawet techniki wysokociśnieniowe, z uwagi na tzw. „ogólny problem elucji”, mają swoje ograniczenia: silnie lipofilowe substancje, o dużym powinowactwie do fazy stacjonarnej, są tak powoli eluowane z kolumny, że odpowiadające im piki są silnie rozmyte i nie jest możliwe oznaczenie ich maksimów. Substancje takie w technice wysokociśnieniowej chromatografii planarnej, z tych samych co poprzednio powodów, nie migrują z linii startu. W praktyce chromatograficznej lipofilowość substancji, opisywaną przez parametr k_w , wyznacza się metodami ekstrapolacyjnymi. Oznacza to, że wykonywane są pomiary dla szeregu faz ruchomych o zmieniającej się zawartości modyfikatora organicznego w fazie ruchomej, a następnie z otrzymanych w ten sposób tzw. funkcji retencji, czyli zależności opisujących wpływ stężenia modyfikatora organicznego na parametry retencyjne, wyznacza się ekstrapolowaną wartość współczynnika retencji w czystej wodzie. Stosuje się w tym celu ekstrapolację funkcji retencji w kierunku zerowego stężenia modyfikatora organicznego w fazie ruchomej, czyli czystej wody jako eluentu. Wyniki tej procedury zależą nie tylko od wyboru funkcji ekstrapolacyjnej, ale także rodzaju i zakresu stężenia modyfikatora organicznego w fazie ruchomej. Najczęściej jako funkcje ekstrapolacyjne stosuje się równanie linii prostej lub wielomian drugiego stopnia.

IV. Część doświadczalna

A. Aparatura i odczynniki

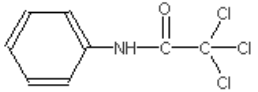
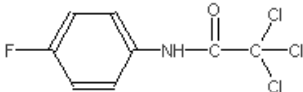
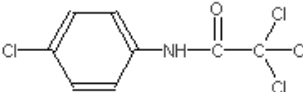
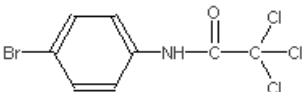
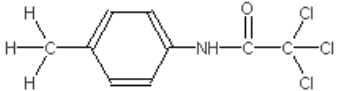
1. Aparatura:

- komory do chromatografii cienkowarstwowej
- pipety szklane: 2 cm³ - 2 szt.
- erlenmayerki 25 cm³ - 4szt.
- lampa UV – 254 nm
- mikrostrzykawka
- linijka
- nożyk do zdrapywania fazy stacjonarnej
- ołówek

2. Odczynniki:

- woda
- dioksan
- płytki do chromatografii cienkowarstwowej TLC RP-18F₂₅₄
- bibuła
- erlenmayerka z chlorkiem etylenu do płukania strzykawki
- roztwory wzorców pestycydów w chlorku etylenu (Tabela 1).

Tabela 1. Badane pestycydy.

Nr substancji	Wzór strukturalny
1	
2	
3	
4	
5	

B. Wyznaczanie retencji pestycydów w mieszanej fazie ruchomej

1. Przygotowanie faz ruchomych

W czterech erlenmayerkach przygotować fazy ruchome o następującym składzie:

1. woda + dioksan ($1,5 \text{ cm}^3 + 1,5 \text{ cm}^3$)
2. woda + dioksan ($1,4 \text{ cm}^3 + 1,6 \text{ cm}^3$)
3. woda + dioksan ($1,3 \text{ cm}^3 + 1,7 \text{ cm}^3$)
4. woda + dioksan ($1,0 \text{ cm}^3 + 2,0 \text{ cm}^3$)

Fazy ruchome należy przygotować z dokładnością do $0,01 \text{ cm}^3$.

2. Przygotowanie płytek do analizy i aplikacja substancji

Aby uniknąć tzw. efektów brzegowych, z dłuższych boków płytek zeszkrobać nożykiem około 1,5 mm fazy stacjonarnej.

Poszczególne substancje należy nanosić wzdłuż krótszego boku płytki ok. 3 mm od jej dolnej krawędzi. Skrajne substancje nanosić w odległości około 6 mm od brzegów płytki a kolejne w równych odległościach (ok. 9 mm) jedna od drugiej. Miejsca dozowania poszczególnych substancji delikatnie oznaczyć ołówkiem. Przy pomocy mikrostrzykawki nanosić po 1 μL każdej substancji na płytkę. Substancje nanosić od razu na wszystkie cztery płytki.

Po naniesieniu każdej substancji kilkakrotnie przepłukać strzykawkę chlorkiem etylenu, aby nie zanieczyszczać wzorców. Przepłukującą ciecz wylewać do oddzielnego pojemnika z bibułą. Przed włożeniem strzykawki do kolejnego wzorca należy wytrzeć ją przy pomocy bibuły.

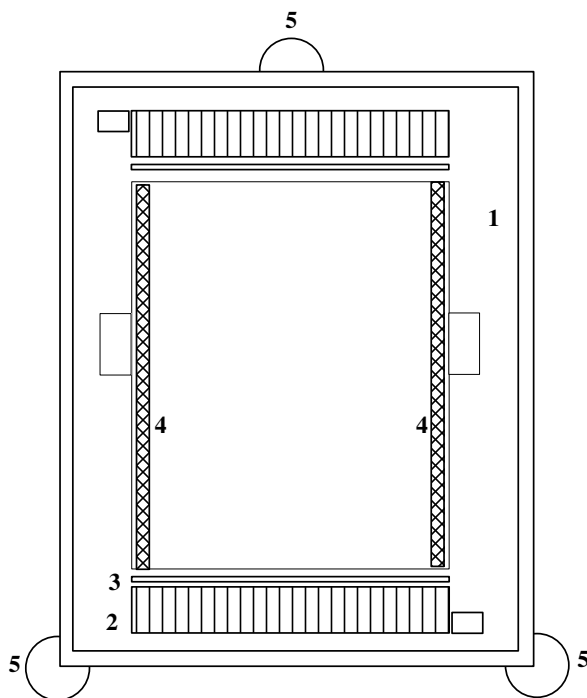
3. Rozwijanie chromatogramu

Wszystkie czynności związane z komorą chromatograficzną (rysunek 3) należy wykonywać ostrożnie, aby nie stłuc szklanych elementów.

- Zdjąć szklaną szybę przykrywającą **1**.
- Umieścić płytkę chromatograficzną na występach **3**.
- Przesunąć maksymalnie płytkę szklaną **2** do dolnego brzegu komory.
- Wlać fazę ruchomą pod płytkę **2** nie wyjmując jej z komory (wlew fazy ruchomej znajduje się z lewej strony płytki **2**).
- Gdy faza ruchoma podpłynie pod płytkę **2** należy ją przesunąć w kierunku występu **3** (do oporu). W takim położeniu faza ruchoma powinna być zassana przez warstwę sorbentu. Jeżeli faza ruchoma nie zostanie zassana, należy poruszyć płytkę chromatograficzną i płytkę szklaną **2** i docisnąć je do siebie (nie wyjmować z komory żadnej z nich).
- Gdy faza ruchoma zostanie zassana, przykryć komorę szkłem **1** i czekać do momentu aż faza ruchoma dojdzie do linii mety – górna krawędź płytki.
- Gdy faza ruchoma dojdzie do linii mety, należy zdjąć szybę **1** i odsunąć płytkę **2** od występu **3** (zasysanie fazy ruchomej zostanie przerwane). Wyjąć płytkę chromatograficzną z komory i umieścić ją pod dygestorium w celu odparowania fazy ruchomej.

W opisany wyżej sposób rozwinąć cztery płytki chromatograficzne używając kolejnych faz ruchomych. Przed zmianą fazy ruchomej dokładnie osuszyć dozownik w komorze.

Po rozwinięciu wszystkich płytek przy pomocy bibuły osuszyć komorę chromatograficzną. Bibułę umieścić pod dygestorium. Resztki fazy ruchomej wylać do butelki z napisem **ZLEWKI**.



Rys. 3. Schematyczny przekrój poziomy komory chromatograficznej.

4. Obliczenie wartości R_F wzorców pestycydów

Aby obliczyć wartości R_F analizowanych pestycydów musimy uwidocznic ich plamki na chromatogramach. W tym celu, wysuszone pod dygestorium płytki, wkładamy w pole świecenia lampy UV 254 nm (lampę włączamy 10 min. wcześniej). Cała płytka świeci, ponieważ wzbudzamy fluorescencję wskaźnika. Plamki pestycydów obserwujemy jako wygaszone obszary.

- Zaznaczyć ołówkiem środki wygaszonych plamek.
- Zmierzyć odległość od linii startu (miejsce nakroplenia plamki) do środka plamki.
- Zmierzyć odległość, jaką przebyła faza ruchoma od linii startu do linii mety.

C. Opracowanie wyników i wnioski

- Obliczyć wartości R_F i $\log k$ wzorców (równania 1 i 3) i zamieścić je w tabeli 2,
- obliczyć ułamki objętościowe (φ_1) i molowe (x_1) dioksanu w fazach ruchomych,
- wykreślić zależności $R_F = f(\varphi_1)$ i $R_F = f(x_1)$,
- wykreślić zależności $\log k = f(\varphi_1)$ i $\log k = f(x_1)$,
- z zależności $\log k = f(x_1)$ wyznaczyć wartości parametrów $\log k_w$ dla wszystkich substancji: stosując ekstrapolację prostoliniową obliczyć wartości współczynników retencji dla czystej wody jako fazy ruchomej ($x_1=0$), czyli wartości $\log k_w$. Obliczone wartości $\log k_w$ zamieścić w tabeli 3. Wartości podziałowych

parametrów lipofilowości **IAllog P** oraz **clog P** to dane literaturowe, obliczone na podstawie struktury cząsteczkowej badanych substancji.

- Wykreślić zależności **IAllog P** = f(log k_w) oraz **clog P** = f(log k_w),
- sformułować wnioski na temat wpływu rodzaju podstawników na właściwości lipofilowe i retencję badanych pestycydów oraz stosowania parametrów chromatograficznych (log k_w) jako parametrów lipofilowości tych substancji.

Tabela 2. Dane doświadczalne

Substancja nr	V _{dioksan} [cm ³] + V _{woda} [cm ³]	φ_l	x_l	R_F	log k
1	1,5 + 1,5				
	1,6 + 1,4				
	1,7 + 1,3				
	2 + 1				
2	1,5 + 1,5				
	1,6 + 1,4				
	1,7 + 1,3				
	2 + 1				
3	1,5 + 1,5				
	1,6 + 1,4				
	1,7 + 1,3				
	2 + 1				
4	1,5 + 1,5				
	1,6 + 1,4				
	1,7 + 1,3				
	2 + 1				
5	1,5 + 1,5				
	1,6 + 1,4				
	1,7 + 1,3				
	2 + 1				

Tabela 3. Chromatograficzne i podziałowe parametry lipofilowości

Substancja nr	log k_w	IAllog P	clog P
1		3,34	3,59
2		3,51	3,99
3		4,06	4,56
4		3,99	4,71
5		3,88	4,09