

Ćwiczenie nr B3

BADANIE MECHANIZMU RETENCJI WYBRANYCH PESTYCYDÓW W NORMALNYM UKŁADZIE FAZ

I. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zbadanie wpływu rodzaju i położenia grup funkcyjnych na adsorpcję pestycydów na żelu krzemionkowym

II. Zagadnienia wprowadzające

1. Podstawowe wiadomości o właściwościach pestycydów
2. Podstawy adsorpcyjnej chromatografii cieczowej
3. Wiązanie wodorowe – charakterystyka oddziaływań, rodzaje wiązania

Literatura obowiązująca:

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

III. Część teoretyczna

III. 1. Charakterystyka pestycydów

Pestycydy to grupa związków syntetycznych, nie występujących w przyrodzie – ksenobiotyków, które są wprowadzane do biocenozy w następstwie zamierzonej decyzji człowieka. Nazwa pestycydy pochodzi od języka łacińskiego *pestis* - szkodnik, plaga oraz *cedeo* - niszczyć i została przyjęta w terminologii międzynarodowej. Zgodnie z definicją zaproponowaną przez Tielę, pestycydy są pojedynczymi substancjami lub ich mieszaninami, przeznaczonymi do ogólnie pojmowanej ochrony fauny i flory oraz produktów ich przetworzenia przed czynnikami niszczącymi takimi jak szkodniki, pleśnie i grzyby. Ze względu na bardzo dużą różnorodność związków należących do grupy pestycydów ich zakres stosowania jest bardzo szeroki. Najczęściej są one wykorzystywane do:

- zwalczania lub wabienia organizmów będących czynnikami chorobotwórczymi dla człowieka lub zwierząt oraz niszczących rośliny lub ich części,
- zwalczania patogenów wywołujących choroby roślin,
- niszczenia chwastów,
- niszczenia listowia lub zwalczania roślin niepożądanych, a nie będących chwastami,
- regulowania lub stymulowania wzrostu roślin lub części roślin (z wyłączeniem nawozów),
- zwalczania czynników powodujących psucie się (gnicie) produktów roślinnych.

Pestycydy można sklasyfikować w oparciu o szereg kryteriów. Najczęściej bierze się pod uwagę ich budowę chemiczną, właściwości toksykologiczne lub ich przeznaczenie. Pod względem chemicznym pestycydy można podzielić na nieorganiczne i organiczne.

Do pestycydów nieorganicznych należą:

- insektycydy arsenowe np. zieleń paryska, arsenian ołowiu,
- insektycydy fluorkowe np. fluorek sodu, kryolit,
- herbicydy np. chloran sodu, boraks, amidosulfonian amonu,
- fungicydy np. ciecz bordowska, siarka, zasadowy chlorek miedzi II.

Wśród pestycydów organicznych można wyróżnić następujące grupy związków:

- **chloroorganiczne** – stosowane do niszczenia owadów; należą do trucizn kontaktowych, nie wykazują szkodliwego działania w stosunku do roślin. Ze względu na duże

powinowactwo do tłuszczów, niewielką biodegradację i bardzo długi czas półtrwania zalicza się je do związków bardzo trwałych,

- **fosforoorganiczne** – są jedną z podstawowych grup insektycydów stosowanych szczególnie w uprawie roślin przemysłowych, w sadownictwie i warzywnictwie. Wszystkie pestycydy należące do tej grupy są podatne na degradację hydrolityczną prowadzącą do rozpuszczalnych w wodzie produktów, które uważa się za nietoksyczne. Ich toksyczność jest zatem krótkotrwała,
- **po pochodne triazynowe** – wykazują dużą toksyczność w stosunku do roślin jedno- i dwuliściennych, są trwałe w glebie i stosowane do niszczenia chwastów w uprawach zbóż, kukurydzy i ziemniaków,
- **po pochodne kwasu karbamidowego** – wykazują małą toksyczność, szybko ulegają rozkładowi w glebie, tworzą mało toksyczne produkty rozkładu. Z tego powodu wypierają insektycydy persystentne – o dużej trwałości,
- **po pochodne kwasów fenoksykarboksylowych** – herbicydy stosowane do niszczenia chwastów dwuliściennych.

Biorąc pod uwagę zastosowanie pestycydów można je podzielić na sześć grup:

	Grupa	Dalszy podział w grupach
I	Zoocydy	- insektycydy (owadobójcze) - akarycydy (roztczobójcze) - nematocydy (nicienobójcze) - rodentocydy (gryzoniobójcze) - moluskocydy (mieczakobójcze) - larwicydy (larwobójcze) - owicydy (niszczenie jaj owadów)
II	Herbicydy (chwastobójcze)	
III	Fungicydy (grzybobójcze)	
IV	Regulatory wzrostu	- defolianty (odlistniające) - desykanty (wysuszające rośliny) - defloranty (usuwające kwiaty)
V	Atraktanty (wabiące)	
VI	Repelenty (odstraszające)	

Pestycydy można również sklasyfikować biorąc pod uwagę ich toksyczność ostrą, która określana jest przez wartość dawki LD₅₀. Jest to średnia dawka, powodująca śmierć

połowy zwierząt doświadczalnych, wyrażona w mg/kg masy ciała po pobraniu drogą pokarmową lub przez skórę lub w mg/4h przy pobraniu drogą oddechową.

Klasa toksyczności - dawka	I (T+) bardzo toksyczne	II (T) toksyczne	III (X_n) szkodliwe	IV mało szkodliwe
LD ₅₀ drogą pokarmową (mg/kg)	<25	25-200	200-2000	>2000
LD ₅₀ przez skórę (mg/kg)	<50	50-400	400-2000	>2000
LD ₅₀ drogą oddechową - aerozole (mg/l/4h)	<0.25	0.25-1	1-5	>5
LD ₅₀ drogą oddechową – gazy i pary (mg/l/4h)	<0.50	0.5-2	2-20	>20

Spośród związków stosowanych jako pestycydy wiele ma działanie kancerogenne, mutagenne i teratogenne (uszkadzające embrion lub płód). Dostają się one do organizmu człowieka i zwierząt przez przewód pokarmowy, drogi oddechowe i skórę. Trudno ulegają przemianom metabolicznym i wobec tego są powoli wydalane z organizmu wraz z moczem, kałem i mlekiem. Ich obecność w organizmie może powodować powstawanie guzów nowotworowych, duszności, podrażnienie układu nerwowego, uszkodzenia szpiku kostnego, chorób skóry itp.

W związku z tym bardzo ważnym problemem jest badanie mechanizmu zatrzymywania pestycydów w glebie oraz wpływu ich budowy cząsteczkowej na wielkość adsorpcji na powierzchni krzemionki.

III.2. Chromatografia planarna – parametry retencji

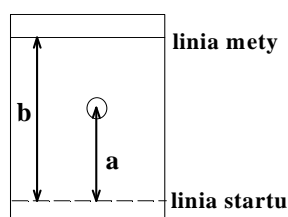
Jedną z technik analitycznych pozwalającą analizować adsorpcję cząsteczek w układach ciało stałe – roztwór jest chromatografia cieczowa. Szczególnie przydatna jest w tych badaniach technika chromatografii cienkowarstwowej pozwalająca szybko i bez zbytnich nakładów finansowych analizować kilkanaście substancji w tym samym czasie.

We wspomnianej technice faza stacjonarna umiejscowiona jest na płytce szklanej, folii aluminiowej lub plastikowej zaś faza ruchoma dostarczana jest z dozownika odpowiednio skonstruowanej komory. W trakcie procesu chromatograficznego badana substancja dzieli się pomiędzy dwie fazy – ruchomą i nieruchomą. W adsorpcyjnej chromatografii cieczowej fazą nieruchomą jest adsorbent, fazą ruchomą ciecz jedno- lub wieloskładnikowa, a retencja

substancji jest wynikiem różnego powinowactwa adsorpcyjnego cząsteczek do miejsc aktywnych adsorbentu. Różnice w powinowactwie adsorpcyjnym (selektywna adsorpcja) są wynikiem różnej budowy i charakteru chemicznego substancji. Substancje wykazujące większe powinowactwo adsorpcyjne do danego adsorbentu są silniej zatrzymywane przez adsorbent (silniej adsorbują się), substancje słabiej adsorbujące się szybciej poruszają się wzdłuż złoża adsorbentu. Miarą podziału substancji pomiędzy dwie fazy jest współczynnik retencji k definiowany jako:

$$k = \frac{\text{ilość substancji w fazie nieruchomej}}{\text{ilość substancji w fazie ruchomej}}$$

Liczbowa wartość k jest w danej temperaturze charakterystyczna dla analizowanej substancji w wybranym układzie chromatograficznym. Zależy ona od rodzaju chromatografowanej substancji (charakter chemiczny i wielkość cząsteczki oraz rodzaj, ilość i rozmieszczenie grup funkcyjnych). W chromatografii cienkowarstwowej parametrem retencyjnym, wyznaczanym wprost z chromatogramu, jest wielkość R_F wyrażana jako:



$$R_F = \frac{a}{b} = \frac{\text{odległość do środka plamki}}{\text{odległość do czoła fazy ruchomej}}$$

Współczynnik retencji k związany jest z wielkością R_F następująco:

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

W zależności od układu chromatograficznego wartość R_F substancji może osiągać wartość $0 \leq R_F \leq 1$. Substancja bardzo silnie adsorbująca się w danym układzie osiąga wartość $R_F = 0$ (zostaje na linii startu). Gdy jej adsorpcja jest minimalna wędruje z czołem fazy ruchomej i wówczas jej $R_F = 1$.

Wielkość R_F (R_M) jest charakterystyczna dla analizowanej substancji. Oznacza to, że wykonując pomiary na danym adsorbencie, w danej temperaturze z użyciem ściśle określonej fazy ruchomej otrzymamy powtarzalne wyniki nawet w długim odstępie czasowym.

III. Badanie mechanizmu retencji substancji w normalnym układzie faz

Badając retencję substancji w zależności od rodzaju i składu fazy ruchomej możemy wysnuć wnioski na temat jej adsorpcji na wybranym adsorbencie. Wielkość adsorpcji substancji będzie zależała od ilości grup funkcyjnych w cząsteczce, ich rodzaju i wzajemnego położenia.

Do badania mechanizmu retencji w układach chromatograficznych przydatne jest równanie Syndera – Soczewińskiego. Równanie to ma postać:

$$R_M = R_{MI} - n \log x_I \quad (2)$$

gdzie: R_M – to R_M w mieszanej fazie ruchomej, R_{MI} – to R_M w czystym polarnym rozpuszczalniku, x_I – to ułamek molowy polarnego składnika fazy ruchomej, n – współczynnik kierunkowy prostej.

Współczynnik n jest parametrem umożliwiającym ocenę wielkości adsorpcji badanej substancji. Opisuje on średnią liczbę cząsteczek polarnego rozpuszczalnika wyrugowanych z powierzchni adsorbentu przez jedną cząsteczkę chromatografowanej substancji. Pozwala również ocenić w jaki sposób adsorbuje się substancja – czy mamy do czynienia z jedno- czy dwupunktową adsorpcją. W przypadku, gdy substancja adsorbuje się na adsorbencie jedną grupą funkcyjną parametr n przyjmuje wartość zbliżoną do 1. Gdy substancja adsorbuje się dwupunktowo parametr n ma wartość zbliżoną do 2. W związku z tym możemy rozróżnić adsorpcję izomerów testowej substancji. Izomery orto- mają zawsze najmniejsze wartości parametru n zaś izomery para- największe. Analizując wartości n możemy również ocenić czy w cząsteczce występuje wewnętrzne wiązanie wodorowe pomiędzy dwoma grupami funkcyjnymi w położeniu orto. Powstanie wewnętrznego wiązania wodorowego pomiędzy dwoma sąsiednimi grupami funkcyjnymi w cząsteczce substancji osłabia jej adsorpcję stąd wartość parametru n będzie mniejsza niż w przypadku gdy takie wiązanie nie powstanie.

Analizując wartości parametru n dla substancji, które posiadają różne grupy funkcyjne w tym samym miejscu możemy porównać wartość energii adsorpcji tych grup.

IV. Część doświadczalna

A. Aparatura i odczynniki

1. Aparatura:

- komory do chromatografii cienkowarstwowej 2 szt.
- pipety szklane 2mL z dokładnością do 0.01mL 2 szt.
- erlenmayerki ze szlifem i korkiem 25 mL 4szt.
- lampa UV – 254 nm
- eksykator
- mikrostrzykawka
- linijka
- nożyk do zdrapywania żelu
- ołówek
- zlewka 25 mL
- miękki papier

2. Odczynniki:

- n-heptan $M = 100.2\text{g/mol}$; $\rho = 0.6838\text{ g/mL}$
- 1,4-dioksan $M = 88.11\text{g/mol}$; $\rho = 1.03\text{g/mL}$
- płytki do chromatografii planarnej pokryte SiO_2 z czynnikiem fluorescencyjnym F_{254} (TLC SiO_2F)
- erlenmayerka z acetonem do płukania strzykawki
- roztwory substancji w acetonie: 1. 4-nitro-2-aminotoluen, 2. 5-nitro-2-aminotoluen
3. 4-amino-3-nitrotoluen, 4. 8-nitrochinolina, 5. 8-aminochinolina

B. Wyznaczanie retencji testowych substancji w mieszanej fazie ruchomej

– Przygotowanie faz ruchomych

W czterech erlenmayerkach przygotować fazy ruchome o następującym składzie:

1. 1,4-dioksan + n-heptan (1.0mL + 3.0mL)
2. 1,4-dioksan + n-heptan (1.2mL + 2.8mL)
3. 1,4-dioksan + n-heptan (1.5mL + 2.5mL)
4. 1,4-dioksan + n-heptan (1.9mL + 2.1mL)

– Przygotowanie płytek do analizy

Substancje należy nanosić wzdłuż krótszego boku płytki. Celem uniknięcia tzw. efektów brzegowych wzdłuż dłuższych boków płytek zeszkrobać nożykiem $\approx 1\text{mm}$ fazy stacjonarnej.

Skrajne substancje należy nanosić na płytkę w odległości $\approx 0.7\text{cm}$ od brzegów płytki, a kolejne w równych odległościach jedna od drugiej (ok. 0.9cm). Miejsca dozowania poszczególnych substancji bardzo delikatnie zaznaczyć ołówkiem. Substancje nanosić mikrostrzykawką w taki sposób, aby ich plamki na adsorbencie miały średnicę max. 1.5mm (ok. $1\mu\text{L}$). W przypadku nakropienia większej plamki nie wymieniać płytki. Substancje nanosić od razu na wszystkie cztery płytki (płytki nie rozwijane w danej chwili umieścić w eksykatorze).

Po naniesieniu każdej substancji 5cio-krotnie przepłukać strzykawkę acetonem aby nie zanieczyszczać wzorców. Przepłukującą ciecz z igły wylewać do oddzielnego pojemnika z bibułą. Przed włożeniem igły strzykawki do kolejnego wzorca należy wytrzeć ją papierem.

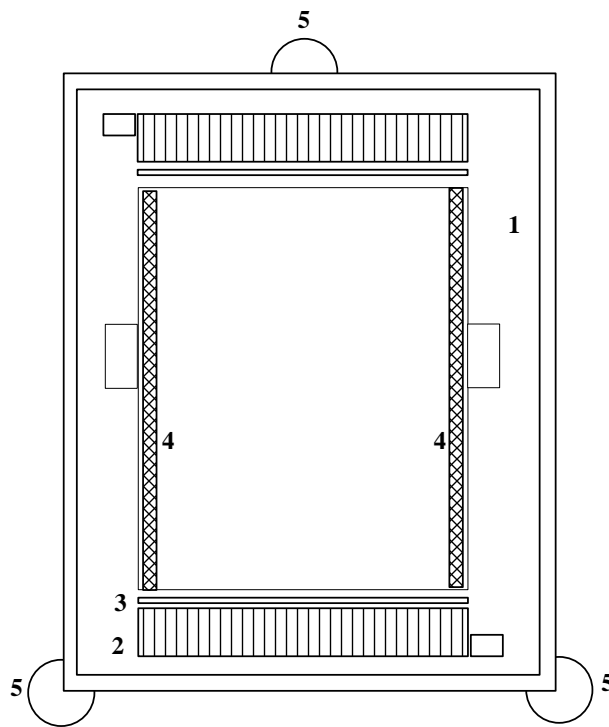
– Rozwijanie chromatogramu

Wszystkie czynności związane z komorą należy wykonywać ostrożnie, aby nie stłuc szklanych elementów.

- zdjąć szklaną szybę przykrywającą **1**
- umieścić płytkę chromatograficzną na występkach **3**
- przesunąć maksymalnie płytkę szklaną **2** do dolnego brzegu komory
- wlać fazę ruchomą pod szklaną 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 adsorbentu. Jeżeli faza ruchoma nie zostanie zassana należy poruszyć płytkę chromatograficzną i szklaną **2** (docisnąć je do siebie ponownie, nie należy 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 – do górnego brzegu 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 ten sposób rozwinąć cztery chromatogramy używając różnych faz ruchomych. Przed zmianą fazy ruchomej dokładnie ususzyć dozownik w komorze z resztek poprzedniej fazy ruchomej

Po zakończeniu pomiarów wyjąć z komory płytkę **2** i bibułę zebrać pozostałą fazę ruchomą. Bibułę umieścić pod dygestorium. Resztki fazy ruchomej pozostałe w erlenmayerkach wylać do butelki pod dygestorium z napisem **ZLEWKI**.



Schematyczny przekrój poziomy komory chromatograficznej

– Wyznaczanie wartości R_F testowych substancji

Aby wyznaczyć wartości R_F analizowanych pestycydów musimy uwidocznić ich plamki na chromatogramach. W tym celu, wysuszone pod dygestorium płytki, wkładamy w pole świecenia lampy UV 254 nm. Cała płytka świeci ponieważ wzbudzamy fluorescencję wskaźnika. Plamki pestycydów obserwujemy jako wygaszone obszary. Następnie:

- 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 (od miejsca nakroplenia substancji do końca płytki)
- obliczyć wartości R_F i R_M wzorców
- zużyte płytki zostawić pod dygestorium

C. Opracowanie wyników i wnioski

- narysować wzory strukturalne analizowanych substancji,
- obliczone wartości R_F i R_M zamieścić w tabeli,
- obliczyć ułamek molowy (x_I) 1.4-dioksanu w fazie ruchomej,
- wykreślić zależności $R_M = f(x_I)$,
- wykreślić zależności $R_M = f(\log x_I)$
- z powyższych zależności wyznaczyć wartości parametru n dla wszystkich substancji i zamieścić je w tabeli,
- na podstawie wartości parametru n oraz budowy cząsteczkowej chromatografowanych substancji określić ich zdolność adsorbowania się na żelu krzemionkowym. Wskazać, która z grup funkcyjnych wykazuje największą adsorpcję w analizowanym układzie. Spostrzeżenia uzasadnić budową cząsteczkową analizowanych związków.

Substancja	x_I	R_F	R_M	n
1				$n =$
2				$n =$
:	:	:	:	: