

A.8. WSPÓŁCZYNNIK PODZIAŁU

1. METODA

Podstawę przedstawionej w pkt 1.4.–1.6. metody wytrząsania w kolbie stanowią Wytyczne OECD ¹⁾.

1.1. Informacje ogólne

Przed przystąpieniem do badań niezbędna jest znajomość informacji dotyczących wartości stałej dysocjacji i hydrolizy, budowy chemicznej (wzoru strukturalnego), rozpuszczalności w wodzie, rozpuszczalności w n-oktanolu i napięcia powierzchniowego badanej substancji.

W przypadku substancji podatnych na dysocjację pomiary powinny być wykonywane tylko dla postaci niezdysoncjowanej (wolny kwas lub wolna zasada), otrzymanych przez zastosowanie odpowiedniego roztworu buforowego o pH niższym, co najmniej o jedną jednostkę (w przypadku wolnego kwasu) lub wyższym (w przypadku wolnej zasady).

Metodyka składa się z opisu dwóch oddzielnych procedur: metody wytrząsania w kolbie i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Metoda wytrząsania w kolbie znajduje zastosowanie wówczas, gdy wartość $\log P_{ow}$ (definicja poniżej) zawarta jest w przedziale od -2 do 4, natomiast metoda chromatograficzna, gdy wartość ta mieści się w przedziale od 0 do 6. Przed przystąpieniem do badań należy wykonać badania wstępne w celu oszacowania wartości współczynnika podziału.

Metoda wytrząsania w kolbie zalecana jest tylko w przypadku czystych substancji rozpuszczalnych w wodzie i w n-oktanolu. Nie jest odpowiednia do wyznaczania współczynnika podziału substancji powierzchniowo czynnych (dla takich substancji wartość współczynnika podziału obliczyć należy na podstawie ich indywidualnych rozpuszczalności w n-oktanolu i w wodzie).

Metody HPLC nie należy stosować w przypadku mocnych kwasów i zasad, związków kompleksowych metali, substancji powierzchniowoczynnych lub substancji, które reagują z eluentem. Dla takich substancji wartość współczynnika podziału obliczyć powinno się na podstawie ich indywidualnych rozpuszczalności w n-oktanolu i w wodzie.

Metoda HPLC jest mniej czuła na obecność zanieczyszczeń badanej substancji w porównaniu z metodą wytrząsania w kolbie. Niemniej jednak, w niektórych przypadkach, zanieczyszczenia mogą powodować trudności przy interpretacji wyników, ponieważ pik może być niespecyficzny. W przypadku badania mieszanin, które dają pasma o słabej rozdzielczości, ustala się górną i dolną granicę wartości $\log P_{ow}$.

1.2. Definicje i jednostki

W rozumieniu rozporządzenia, współczynnik podziału (P_{ow}) jest to stosunek stężeń równowagowych (c_i) substancji rozpuszczonej w układzie dwufazowym, składającym się z dwóch niemieszających się rozpuszczalników. W przypadku n-oktanolu i wody wyraża się on wzorem:

$$P_{ow} = \frac{c_{n-oktanol}}{c_{woda}}$$

Współczynnik podziału (P_{ow}) jest wyrażony ilorazem dwóch stężeń i często przedstawia się go w postaci logarytmu dziesiętnego ($\log P_{ow}$).

1.3. Substancje kontrolne

Metoda wytrząsania w kolbie

Nie ma potrzeby stosowania substancji kontrolnych we wszystkich badaniach. Substancje kontrolne stosować należy do okresowego sprawdzania metody i porównywania z innymi metodami.

Metoda HPLC

W celu skorelowania zmierzonych wartości dla badanej substancji metodą HPLC wykonać należy wykres kalibracyjny $\log P_{ow}$ w zależności od wyników otrzymanych metodą chromatograficzną dla co najmniej 6 punktów kontrolnych. Odpowiednie substancje kontrolne dobrać powinien wykonujący badanie. Jeżeli jest to

¹⁾ OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.

możliwe, należy dobrać co najmniej jedną substancję kontrolną o P_{ow} o wartości wyższej od wartości P_{ow} dla badanej substancji i drugą o wartości niższej. Dla wartości $\log P_{ow}$ niższych od 4 do kalibracji można wykorzystać wartości otrzymane metodą wytrząsania w kolbie. Dla wartości $\log P_{ow}$ wyższych od 4 do kalibracji można przyjąć wartości otrzymane z uznanych pozycji piśmiennictwa, o ile są one zgodne z wartościami obliczonymi. Dla uzyskania większej dokładności należy dobrać takie substancje kontrolne, które mają budowę strukturalną podobną do budowy badanej substancji.

Dla wielu grup substancji wartości $\log P_{ow}$ są dostępne w piśmiennictwie ^{1), 2)}. Jeżeli wartości współczynników podziału dla substancji o podobnej budowie strukturalnej nie są dostępne, wtedy kalibrację należy wykonać wykorzystując do tego wartości dla innych substancji kontrolnych.

Wykaz zalecanych substancji kontrolnych i ich wartości P_{ow} przedstawiono w tabeli A.7.1.

TABELA A.7.1. ZALECANE SUBSTANCJE KONTROLNE DLA METODY HPLC

Nr	Substancja kontrolna	$\log P_{ow}$	pKa
1	Butanon-2	0,3	
2	4-Acetylopirydyna	0,5	
3	Anilina	0,9	
4	Acetanilid	1,0	
5	Alkohol benzylowy	1,1	
6	p-Metoksyfenol	1,3	pKa = 10,26
7	Kwas fenoksyoctowy	1,4	pKa = 3,12
8	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-Dwunitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	Benzonitryl	1,6	
11	Fenylacetonyl	1,6	
12	Alkohol 4-metylobenzylowy	1,6	
13	Acetofenon	1,7	
14	2-Nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	Kwas 3-nitrobenzoesowy	1,8	pKa = 3,47
16	4-Chloroanilina	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobenzen	1,9	
18	Alkohol cynamonowy	1,9	
19	Kwas benzoowy	1,9	pKa = 4,19
20	p-Krezol	1,9	pKa = 10,17
21	Kwas cynamonowy	2,1	pKa = 3,89 cis 4,14 trans
22	Anizol	2,1	
23	Benzoesan metylu	2,1	
24	Benzen	2,1	
25	Kwas 3-metylobenzoowy	2,4	pKa = 4,27
26	4-Chlorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	Trójchloroetylen	2,4	
28	Atrazyna	2,6	
29	Benzoesan etylu	2,6	
30	2,6-Dwuchlorobenzonitryl	2,6	
31	Kwas 3-chlorobenzoowy	2,7	pKa = 3,82
32	Toluen	2,7	
33	1-Naftol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-Dwuchloroanilina	2,8	
35	Chlorobenzen	2,8	
36	Eter allilowofenyłowy	2,9	
37	Bromobenzen	3,0	
38	Etylobenzen	3,2	

¹⁾ C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).

²⁾ Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

Nr	Substancja kontrolna	log P _{ow}	pKa
39	Benzofenon	3,2	pKa = 9,54
40	4-Fenylofenol	3,2	
41	Tymol	3,3	
42	1,4-Dwuchlorobenzen	3,4	pKa = 0,79
43	Dwufenyloamina	3,4	
44	Naftalen	3,6	
45	Benzoesan fenylu	3,6	
46	Izopropylobenzen	3,7	pKa = 6
47	2,4,6-Trójchlorobenzen	3,7	
48	Dwufenyl	4,0	
49	Benzoesan benzylu	4,0	
50	2,4-Dwunitro-6-sec-butylofenol	4,1	
51	1,2,4-Trójchlorobenzen	4,2	
52	Kwas dodekanowy	4,2	
53	Eter dwufenylowy	4,2	
54	n-Butylobenzen	4,6	
55	Fenantren	4,5	
56	Fluoranten	4,7	
57	Dwubenzyl	4,8	
58	2,6-Dwufenylopirydyna	4,9	
59	Trójfenyloamina	5,7	
60	DDT	6,2	

Inne substancje kontrolne o niskim log P _{ow}		
1	Kwas nikotynowy	0,07

1.4. Zasady stosowanych metod badań

1.4.1. Metoda wytrąsania w kolbie

Aby wyznaczyć współczynnik podziału, należy doprowadzić do stanu równowagi między wszystkimi składnikami badanego układu i oznaczyć stężenia substancji rozpuszczonej w obydwu fazach. W tym celu można stosować różne techniki np. mieszanie dwóch faz, następnie rozdzielanie ich i wyznaczenie stężenia równowagi dla badanej substancji.

1.4.2. Metoda HPLC

W metodzie HPLC należy stosować kolumnę wypełnioną fazą stałą, zawierającą długie łańcuchy węglowodorowe (np. C₈, C₁₈) chemicznie osadzone na krzemionce. Substancje i preparaty chemiczne wprowadzane na kolumnę przenoszone są wzdłuż niej z różnymi prędkościami dzięki różnym współczynnikom podziału pomiędzy fazą ruchomą a węglowodorową fazą stacjonarną. Mieszaniny substancji chemicznych są wymywane w kolejności zgodnej z ich właściwościami hydrofobowymi, tj. substancje rozpuszczalne w wodzie są eluowane w pierwszej kolejności, a rozpuszczalne w olejach ostatnie, proporcjonalnie do ich współczynnika podziału w układzie węglowódor-woda. Umożliwia to wyznaczenie zależności między czasem retencji na danej kolumnie (w fazie odwracalnej) i współczynnikiem podziału n-oktanol/woda. O wartości współczynnika podziału wnioskować należy na podstawie *współczynnika pojemnościowego* k, wyrażonego wzorem:

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

gdzie:

t_r - jest czasem retencji substancji,

t₀ - jest średnim czasem, jaki potrzebuje cząsteczka rozpuszczalnika na przejście przez kolumnę (czas martwy).

Nie jest wymagana ilościowa analiza chemiczna, można oznaczyć tylko czas retencji.

1.5. Kryteria wiarygodności badań

1.5.1. Powtarzalność

Metoda wytrząsania w kolbie

W celu zapewnienia dokładności wyznaczenia współczynnika podziału, badania powtarzać należy wykonując je w trzech różnych wariantach, stosując różne ilości badanej substancji i różne proporcje objętości rozpuszczalników. Wartości $\log P_{ow}$ wyliczone na podstawie wyników z różnych pomiarów nie mogą się różnić o więcej niż $\pm 0,3$ jednostki.

Metoda HPLC

W celu zwiększenia stopnia pewności wyników pomiarów, oznaczenia wykonać należy dwukrotnie. Wartości $\log P_{ow}$ wyliczone na podstawie wyników z różnych pomiarów nie mogą się różnić o więcej niż $\pm 0,1$ jednostki.

1.5.2. Czułość

Metoda wytrząsania w kolbie

Zakres pomiarowy metody uwarunkowany jest granicami wykrywalności zastosowanej metody analitycznej, która powinna umożliwić określenie wartości $\log P_{ow}$ w zakresie od -2 do 4 (niekiedy, jeśli warunki to umożliwiają, zakres może być rozszerzony do 5), gdy stężenie substancji rozpuszczonej w obu fazach jest nie większe niż $0,01 \text{ mol/dm}^3$.

Metoda HPLC

Metoda HPLC umożliwia wyznaczanie współczynników podziału dla wartości $\log P_{ow}$ w zakresie od 0 do 6. Zwykle współczynnik podziału substancji może być wyznaczony metodą wytrząsania w kolbie z dokładnością ± 1 log jednostki. Typowe zależności można znaleźć w piśmiennictwie ^{1), 2), 3), 4), 5)}. Większą dokładność można osiągnąć sporządzając wykresy korelacji dla substancji kontrolnych o podobnej budowie ⁶⁾.

1.5.3. Specyficzność

Metoda wytrząsania w kolbie

Prawo podziału Nernsta stosuje się tylko do roztworów rozcieńczonych w warunkach stałej temperatury, ciśnienia i pH. Stosować je należy tylko w przypadku substancji czystej rozdzielonej między dwa czyste rozpuszczalniki. Jeżeli kilka różnych substancji będzie jednocześnie rozpuszczonych w jednej lub obydwu fazach, może wpływać to negatywnie na wyniki badania.

Dysocjacja lub asocjacja rozpuszczonych cząsteczek powoduje odstępstwa od prawa podziału Nernsta. Na ich występowanie wskazuje zależność wartości współczynnika podziału od stężenia substancji w roztworze.

Z powodu możliwości osiągania wielu stanów równowagi, metoda ta nie powinna być stosowana bez uwzględnienia odpowiednich poprawek do badań substancji dysocjujących. Dla takich substancji wskazane jest stosowanie zamiast wody roztworów buforowych; pH roztworu buforowego powinno być mniejsze o co najmniej 1 jednostkę pH od pK_a substancji.

1.6. Opis metody

1.6.1. Wstępna ocena współczynnika podziału

Wstępnie współczynnik podziału może być oszacowany metodą obliczeniową lub, gdy jest to możliwe, na podstawie stosunku rozpuszczalności badanej substancji w czystych rozpuszczalnikach ⁷⁾.

¹⁾ L. Renberg, G. Sundstroem and K. Sundh-Nygaard, *Chemosphere* Vol. 80, 683 (1980).

²⁾ H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, *Pestic. Sci.* 12, 219 (1981).

³⁾ B. McDuffe, *Chemosphere* 10, 73 (1981).

⁴⁾ W.E. Hammers et al., *J. Chromatogr.* 247, 1 (1982).

⁵⁾ J.E. Haky and A.M. Young, *J. liq. Chromat.* 7, 675 (1984).

⁶⁾ S. Fujisawa and E. Masuhara, *J. Biomed. Mater. Res.* 15, 787 (1981).

⁷⁾ O. Jübermann, Verteilen und Extrahieren, in *Methoden der Organischen Chemie* (Houben Weyl), Band I/I, Allgemeine Laboratoriumspraxis (edited by E. Müller), pp. 223-239, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1958).

1.6.2. Metoda wytrząsania w kolbie

1.6.2.1. *Czynności przygotowawcze*

Do wyznaczania współczynnika podziału powinien być stosowany w badaniu czysty n-oktanol.

Do wyznaczania współczynnika podziału musi być stosowana woda podwójnie destylowana w destylatorze szklanym lub kwarcowym. Dla substancji dysocjujących zamiast wody należy stosować roztwory buforowe.

Nie należy stosować wody uzyskanej z wymiennicza jonowego.

1.6.2.1.1. *Wstępne wysycanie rozpuszczalników*

Przed wyznaczeniem współczynnika podziału, obydwa rozpuszczalniki należy wysycać w temperaturze pomiaru. W tym celu w wytrząsarce mechanicznej trzeba wytrząsać przez 24 godziny dwie duże butle, jedną zawierającą n-oktanol i odpowiednią ilość wody, drugą zawierającą wodę z odpowiednią ilością n-oktanolu. Po wytrząsaniu roztwory pozostawić należy aż do rozdzielenia się faz.

1.6.2.1.2. *Przygotowania do badania*

Naczynie pomiarowe powinno być wypełnione do pełna roztworem zawierającym dwie fazy w celu zabezpieczenia przed stratami materiału przez odparowanie.

Stosunek objętościowy n-oktanolu do wody i ilość badanej substancji należy dobierać biorąc pod uwagę:

- wstępne oszacowanie współczynnika podziału (jak wyżej),
- minimalne ilości substancji, zgodnie z wymaganiami metody analitycznej,
- maksymalne stężenie substancji w każdej z faz nieprzekraczające $0,01 \text{ mol/dm}^3$.

Wykonać należy trzy badania. W pierwszym używa się n-oktanolu i wody w obliczonym stosunku objętościowym, w drugim badaniu dobrany stosunek objętościowy dzieli się przez dwa, w trzecim badaniu mnoży się przez dwa (np. 1:1; 1:2; 2:1).

1.6.2.1.3. *Badana substancja*

Należy przygotować roztwór podstawowy, wstępnie nasycony wodą, o znanym stężeniu badanej substancji w n-oktanolu. Przed wyznaczeniem współczynnika podziału należy precyzyjnie oznaczyć stężenie roztworu podstawowego. Roztwór powinien być przechowywany w warunkach zapewniających jego stabilność.

1.6.2.2. *Warunki badania*

Badanie przeprowadzać należy w stałej temperaturze ($\pm 1^\circ\text{C}$) w zakresie od 20 do 25°C .

1.6.2.3. *Procedura pomiaru*

1.6.2.3.1. *Ustalenie podziału w stanie równowagi*

Do każdego pomiaru należy przygotować po dwa naczynia zawierające dokładnie odmierzone ilości dwóch rozpuszczalników i roztworu podstawowego.

N-oktanol powinien być odmierzany objętościowo. Naczynia, w których prowadzony jest pomiar, powinny być umieszczone w wytrząsarce lub należy wytrząsać je ręcznie. Sposobem zalecanym jest szybkie obracanie próbek wirówki o 180° wokół ich poprzecznej osi tak, aby powietrze nie przechodziło przez obydwie fazy. Zazwyczaj do osiągnięcia podziału w stanie równowagi wystarcza 50 takich obrotów. Zalecane jest wykonanie 100 obrotów w czasie 5 minut.

1.6.2.3.2. *Rozdział faz*

Jeżeli jest to konieczne, w celu rozdzielenia faz, mieszaninę wirować należy w wirówce laboratoryjnej w temperaturze pokojowej lub jeżeli wirówka nie posiada możliwości regulacji temperatury, próbki wirówki powinny być przetrzymane w temperaturze pomiaru, co najmniej jedną godzinę przed wykonaniem analizy.

1.6.2.4. *Oznaczanie*

W celu wyznaczenia współczynnika podziału konieczne jest oznaczenie stężenia badanej substancji w obydwu

fazach. Oznaczania należy wykonać przez pobranie z każdego naczynia badawczego próbki każdej fazy i oznaczenie substancji wybraną metodą. Oblicza się całkowitą zawartość substancji w obydwu fazach i porównuje z ilością substancji wprowadzonej.

W celu zapewnienia pobrania tylko fazy wodnej bez zanieczyszczenia n-oktanołem można użyć szklanej strzykawki z wymienną igłą. Strzykawkę częściowo napełnić należy powietrzem, które wyciska się dokładnie w czasie przechodzenia igły przez warstwę n-oktanolu. Do strzykawki pobrać trzeba odpowiednią objętość fazy wodnej. Strzykawkę należy szybko wyjąć z roztworu i odłączyć igłę. Zawartość strzykawki może być traktowana jako próbka fazy wodnej. Stężenie w obydwu fazach powinno być oznaczane metodą specyficzną dla badanej substancji. Oznaczania można dokonać:

- metodami fotometrycznymi,
- metodą chromatografii gazowej,
- metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej.

1.6.3. Metoda HPLC

1.6.3.1. Przygotowania do badania

Aparatura

Do oznaczenia służy chromatograf cieczowy, wyposażony w pompę niepulsacyjną i odpowiedni detektor. Zalecane jest stosowanie zaworu dozującego z obiegiem. Obecność grup polarnych w fazie stacjonarnej może w poważnym stopniu osłabiać działanie kolumny HPLC, jednakże faza stacjonarna powinna zawierać minimalny procent grup polarnych¹⁾. Można stosować mikrocząsteczkowe wypełnienia fazy odwróconej lub gotowe kolumny pakowane. Kolumna zabezpieczająca może być umieszczona między układem wtrowskowym i kolumną analityczną.

Faza ruchoma

Do przygotowania rozpuszczalnika eluującego należy stosować wcześniej odgazowane metanol i wodę destylowaną o stopniu czystości dla HPLC. Stosować należy elucję izokratyczną. Mieszanina metanol-woda powinna zawierać minimum 25% wody. Typowa mieszanina metanolu i wody w objętościowym stosunku 3:1 jest właściwa do eluowania substancji o wartości $\log P_{ow}$ równym 6, w czasie 1 godziny, przy prędkości przepływu 1 ml/min. Dla substancji o wartości $\log P_{ow}$ powyżej 6 może być konieczne skrócenie czasu retencji (także dla substancji kontrolnej) przez obniżenie polarności fazy ruchomej lub skrócenie kolumny.

W metodzie HPLC substancje o bardzo małej rozpuszczalności w n-oktanolu dają nienaturalnie niskie wartości $\log P_{ow}$; piki takich substancji czasami nie są oddzielone od piku rozpuszczalnika. Prawdopodobnie jest to spowodowane tym, że w metodzie HPLC procesy rozdziału w kolumnie zmierzające do osiągnięcia równowagi, w czasie zazwyczaj stosowanym w badaniu, przebiegają zbyt wolno. W takim przypadku, w celu uzyskania realnych wyników, stosować należy zmniejszenie prędkości przepływu przez kolumnę oraz zmniejszenie ilości metanolu w stosunku do ilości wody.

Dla zapewnienia odpowiedniej wykrywalności, badana substancja i substancje kontrolne powinny być rozpuszczalne w odpowiednim stężeniu w fazie ruchomej. Tylko w wyjątkowych przypadkach można stosować dodatki do mieszaniny metanol-woda; mogą one jednak zmieniać właściwości kolumny. W takich przypadkach należy zastosować oddzielną kolumnę tego samego typu. Jeżeli mieszanina metanol-woda nie jest odpowiednia, można zastosować inną mieszaninę woda-rozpuszczalnik, np. etanol-woda lub acetonitryl-woda.

Wartość pH eluentu jest parametrem krytycznym dla substancji dysocjujących. Powinno być ono utrzymywane w zakresie pracy kolumny, zwykle między 2 i 8. Zaleca się stosowanie roztworów buforowych. Należy zabezpieczać się przed wytrącaniem się soli i zniszczeniem kolumny niektórymi mieszaninami organicznymi faza/roztwór buforowy. Oznaczenia metodą HPLC na krzemionkowej fazie stacjonarnej nie są zalecane dla pH o wartości powyżej 8. Z tego też względu stosowanie fazy ruchomej o odczynie alkalicznym może doprowadzić do szybkiego obniżenia sprawności kolumny.

Substancje rozpuszczone

Substancje kontrolne powinny być o jak najwyższym, z możliwych do osiągnięcia, stopniu czystości. Jeżeli jest to możliwe, substancje badane lub kontrolne rozpuszczać należy w fazie ruchomej.

Warunki badania

Temperatura w czasie badania nie powinna się zmieniać o więcej niż ± 2 K.

¹⁾ R.F. Rekker and H.M. de Kort: Euro. J. Med. Chem. 14, 479 (1979).

1.6.3.2. Wykonanie pomiaru

Obliczenie czasu martwego t_0

Czas martwy t_0 można wyznaczać albo za pomocą szeregu homologicznego (np. ketonów n-alkilometylowych) lub związków organicznych, które nie są zatrzymywane na kolumnie (np. tiomocznika lub formamidu). Do obliczenia czasu martwego t_0 przy zastosowaniu szeregu homologicznego wyznaczyć należy czasy retencji dla siedmiu przedstawicieli szeregu homologicznego. Czasy retencji $t_{r(nc+1)}$ wykreślić trzeba w zależności od $t_{r(nc)}$ (n_c oznacza liczbę atomów węgla) i wyznaczyć współczynnik nachylenia (a) oraz punkt przecięcia (b) z osią y funkcji regresji:

$$t_{r(nc+1)} = a + b t_{r(nc)}$$

Czas martwy oblicza się ze wzoru:

$$t_0 = a/(1-b)$$

Krzywa wzorcowa

Następnym etapem jest wykonanie wykresu funkcji wartości $\log k$ od $\log P_{ow}$ dla odpowiednich substancji kontrolnych. Stosować należy jednocześnie od 5 do 10 substancji kontrolnych, których wartości $\log P_{ow}$ znajdują się w pobliżu spodziewanego zakresu. Wyznacza się czasy retencji, najlepiej rejestrując je na integratorze podłączonym do układu detekcji. Należy obliczyć odpowiednie wartości logarytmów współczynników pojemnościowych $\log k$ i nanieść na wykres w postaci funkcji $\log P_{ow}$ wyznaczonych metodą wytrząsania w kolbie. W celu uwzględnienia możliwych zmian w działaniu kolumny kalibrowanie należy wykonać w regularnych przedziałach czasu, co najmniej raz dziennie.

Wyznaczanie współczynnika pojemnościowego

Badaną substancję wprowadzić należy do kolumny w możliwie małej ilości fazy ruchomej. Czas retencji wyznaczyć powinno się dwukrotnie. Wyznaczyć należy też współczynnik pojemnościowy k . Współczynnik podziału badanej substancji otrzymywany jest przez interpolację z wykresu korelacji dla substancji kontrolnej. W przypadku bardzo niskich lub bardzo wysokich współczynników podziału konieczna może być ekstrapolacja. W tych przypadkach należy zwrócić uwagę na granice ufności wykresu regresji.

2. WYNIKI BADAŃ

Metoda wytrząsania w kolbie

Dokładność wyznaczonych wartości P_{ow} należy sprawdzić przez porównanie średniej otrzymanej z dwóch próbek ze średnią ze wszystkich otrzymanych wyników.

3. SPRAWOZDANIE

Sprawozdanie powinno zawierać, z uwzględnieniem zakresu przeprowadzonych badań, następujące informacje:

- nazwę chemiczną i zanieczyszczenie substancji,
- jeśli metoda nie może być zastosowana (np. dla substancji powierzchniowoczynnych), podać obliczoną wartość na podstawie rozpuszczalności substancji w n-oktanolu i w wodzie.

Ponadto w sprawozdaniu zamieścić należy wszystkie informacje i uwagi niezbędne do interpretacji wyników, w szczególności dotyczące zanieczyszczeń i fizycznej postaci substancji.

W zależności od stosowanej metody w sprawozdaniu należy podać dodatkowo:

Dla metody wytrząsania w kolbie

- wynik wstępnego oszacowania, jeżeli było wykonywane,
- temperaturę badania,
- dane o metodzie analitycznej zastosowanej do oznaczania substancji,
- czas i prędkość wirowania, jeżeli je stosowano,
- wyznaczone stężenia w obydwu fazach dla każdego oznaczenia (powinno się podać 12 wartości stężeń),
- masę badanej substancji, objętość każdej z zastosowanych faz w każdym naczyniu badawczym i całkowitą obliczoną ilość badanej substancji znajdującą się w każdej fazie po osiągnięciu stanu równowagi,
- obliczone wartości współczynników podziału (P_{ow}) i wartość średnią dla każdego z warunków badania jako średnią ze wszystkich oznaczeń. Jeżeli występuje zależność współczynnika podziału od stężenia, to należy ten fakt odnotować,

- standardowe odchylenie pojedynczych wartości P_{ow} od wartości średniej,
- średnią wartość P_{ow} obliczoną ze wszystkich oznaczeń w postaci jej logarytmu dziesiętnego,
- obliczoną wartość teoretyczną P_{ow} jeżeli była wyznaczana lub jeżeli zmierzona wartość jest większa od 10^4 ,
- pH wody i roztworów wodnych w czasie badania,
- jeżeli stosowano roztwór buforowy, należy uzasadnić jego zastosowanie zamiast wody oraz podać skład, stężenie i pH roztworów buforowych, pH faz wodnych przed i po badaniu.

Dla metody HPLC

- wyniki wstępnego oszacowania, jeżeli było wykonywane,
- nazwę badanej substancji i substancji kontrolnej oraz ich czystość,
- zakres temperatury badań,
- wartość pH dla wszystkich wykonanych badań,
- opis kolumny analitycznej, kolumny zabezpieczającej, fazy ruchomej, średnią wykrywalność,
- dane dotyczące czasu retencji i literaturowe wartości $\log P_{ow}$ substancji kontrolnych stosowanych do kalibracji,
- szczegółowy wykres regresji (w funkcji $\log k$ od $\log P_{ow}$),
- średnie dane dotyczące czasu retencji i interpolowaną wartość $\log P_{ow}$ dla badanej substancji,
- opis aparatury i parametrów jej pracy,
- profile wymywania,
- ilości badanych substancji i substancji kontrolnych wprowadzanych do kolumny,
- wartość czasu martwego i sposób jego wyznaczenia.

Opisy metod znaleźć można także w innych pozycjach piśmiennictwa ^{1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10), 11), 12)}.

¹⁾ A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, Vol. 71, 525.

²⁾ R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

³⁾ NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use - Determination of partition coefficient Shake flask method.

⁴⁾ C.V. Eadforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, Vol. 12, 1459.

⁵⁾ A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, Vol. 71, 525.

⁶⁾ C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani and E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, Vol. 16, 1207.

⁷⁾ W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, Vol. 8, 1113.

⁸⁾ D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, Vol. 10, 382.

⁹⁾ J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivitat von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1979.

¹⁰⁾ R. Franke, Theoretical Drug Design, Marcel Dekker, New York, Basel 1978.

¹¹⁾ Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Basel 1978.

¹²⁾ N.S. Nirrless, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, Vol. 19, 615.

OBLICZENIA - METODY SZACOWANIA

WPROWADZENIE

Ogólne wprowadzenie do metod obliczeniowych oraz dane i przykłady przedstawione są w piśmiennictwie ¹⁾.

Obliczone wartości P_{ow} służą do:

- wyboru metody badawczej (metoda wytrząsania w kolbie dla wartości $\log P_{ow}$ od -2 do 4 oraz metoda HPLC dla wartości $\log P_{ow}$ między 0 i 6),
- wyboru warunków badania (np. substancje kontrolne dla HPLC, stosunek metanol/woda dla metody wytrząsania w kolbie),
- wewnętrznej kontroli laboratoryjnej do sprawdzenia błędów badania,
- oszacowania wartości P_{ow} , jeżeli metoda doświadczalna nie może być zastosowana z przyczyn technicznych.

METODA SZACOWANIA

Wstępne oszacowanie współczynnika podziału.

Wartość współczynnika podziału może być oszacowana na podstawie rozpuszczalności badanej substancji w czystych rozpuszczalnikach według wzoru:

$$P_{oszacowane} = \frac{\text{nasycone } c_{n\text{-oktanol}}}{\text{nasycone } c_{woda}}$$

METODY OBLICZENIOWE

Zasada metod obliczeniowych

Wszystkie metody obliczeniowe opierają się na teoretycznym podziale cząstki na odpowiednie składniki, dla których znane są wiarygodne wartości P_{ow} . Wartość $\log P_{ow}$ dla całej cząstki otrzymuje się przez sumowanie wartości cząstkowych skorygowanych o interakcje międzycząstkowe. Wartości stałych cząstkowych i współczynniki korekcyjne są dostępne w piśmiennictwie ^{2), 3), 4), 5)}. Niektóre z nich zostały uaktualnione ⁶⁾.

Kryteria jakościowe

Wiarygodność metody obliczeniowej zmniejsza się wraz ze wzrostem złożoności struktury badanej substancji. W przypadku prostych cząsteczek o niskiej masie cząsteczkowej i posiadających jedną do dwóch grup funkcyjnych spodziewana różnica pomiędzy wynikami obliczeń i pomiarów wynosi od 0,1 do 0,3 jednostki $\log P_{ow}$. W przypadku cząsteczek bardziej złożonych granica błędu może być większa. Wielkość błędu będzie zależała od rzetelności i dostępności stałych dla poszczególnych składników cząsteczki, możliwości rozpoznania interakcji między cząsteczkami (np. wiązań wodorowych) i stosowanych współczynników korekcyjnych (rozwiązanie tego problemu ułatwia program komputerowy CLOGP-3) ⁷⁾. W przypadku substancji dysocjujących musi być brany pod uwagę stopień dysocjacji.

¹⁾ J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1983).

²⁾ Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

³⁾ C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).

⁴⁾ A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev. 71, 525 (1971).

⁵⁾ R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. - Chim. Ther. 14, 479 (1979).

⁶⁾ Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med.Chem. Software (Program CLOGP-3).

⁷⁾ Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med.Chem. Software (Program CLOGP-3).

Procedury obliczeń*Metoda Hansch'a π*

Stała hydrofobowego podstawnika (π) wprowadzona przez Fujita i wsp.¹⁾ definiowana jest następująco:

$$\pi X = \log P_{ow}(PhX) - \log P_{ow}(PhH),$$

gdzie $P_{ow}(PhX)$ jest współczynnikiem podziału pochodnej aromatycznej i $P_{ow}(PhH)$ substancji macierzystej

$$[\text{np. } \pi_{Cl} = \log P_{ow}(C_6H_5Cl) - \log P_{ow}(C_6H_6) = 2,84 - 2,13 = 0,71].$$

Zasadniczo metodę π stosuje się do związków aromatycznych. Wartości π dla wielu substancji są dostępne w piśmiennictwie^{2), 3), 4)}. Stosuje się je do obliczania wartości $\log P_{ow}$ dla cząsteczek aromatycznych i ich pochodnych.

Metoda Rekkera

W metodzie Rekkera⁵⁾ wartość $\log P_{ow}$ oblicza się następująco:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum (\text{współczynniki interakcji})$$

gdzie:

f_i oznacza stałe różnych części cząsteczki, natomiast a_i jest liczbą wskazującą częstość ich występowania w badanej cząsteczce. Współczynniki interakcji mogą być wyrażone jako całkowita wielokrotna jednej stałej C_m (tzw. „stała magiczna”). Stałe składników f_i oraz C_m mogą być wyznaczone z listy 1054 doświadczalnie wyznaczonych wartości P_{ow} (dla 825 substancji) przy zastosowaniu metody wielokrotnej analizy regresji^{6), 7)}. Wyznaczanie współczynników interakcji odbywa się zgodnie z zasadami opisanymi w piśmiennictwie^{8), 9), 10)}.

Metoda Hansch-Leo

W metodzie Hansch'a i Leo¹¹⁾ wartość $\log P_{ow}$ oblicza się następująco:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

gdzie:

f_i oznacza stałe różnych fragmentów cząsteczki, F_j jest współczynnikiem korekcyjnym, natomiast a_i i b_j odpowiadają częstościom ich występowania w cząsteczce.

Wartości odbiegające od P_{ow} wyznaczonych doświadczalnie, atomowych i grupowych oraz współczynniki korekcyjne F_j zostały wyznaczone metodą prób i błędów. Współczynniki korekcyjne zostały podzielone na kilka różnych kategorii^{12), 13)}. Uwzględnienie wszystkich zależności i współczynników korekcyjnych jest

¹⁾ T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964, Vol. 86, 5175.

²⁾ Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

³⁾ C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).

⁴⁾ A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev. 71, 525 (1971).

⁵⁾ R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochimistry Library, Vol.1, Elsevier, New York (1977).

⁶⁾ C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).

⁷⁾ C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere 12, 1459 (1983).

⁸⁾ R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. - Chim. Ther. 14, 479 (1979).

⁹⁾ C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere 12, 1459 (1983).

¹⁰⁾ R.A. Scherrer, ACS - Symposium Series 255, p. 225, American Chemical Society, Washington, D.C. (1984).

¹¹⁾ C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).

¹²⁾ J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1983).

¹³⁾ C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).

skomplikowane i pracochłonne. Do takich obliczeń opracowano pakiety programów komputerowych ¹⁾.

Metoda kombinowana

Obliczanie P_{ow} cząstek złożonych można wykonywać, jeżeli wartości $\log P_{ow}$ dla podgrup, na które można substancję podzielić, dostępne są z tabel ^{1), 2)} lub z pomiarów. Wartości dla niektórych składników (cząstki) (np. związki heterocykliczne, antrachinon, azobenzen) mogą być obliczone z wartości π Hansch'a lub z wartości stałych dla składników Rekker'a lub Leo.

Uwagi:

1. Metody obliczeniowe mogą być stosowane tylko dla substancji częściowo lub całkowicie zdysocjowanych i przy zastosowaniu odpowiednich współczynników korekcyjnych.
2. Jeżeli stwierdza się międzycząsteczkowe wiązania wodorowe to należy dodać odpowiednie współczynniki korygujące (w przybliżeniu od +0,6 do +1,0 jednostki $\log P_{ow}$). Informacje o obecności tych połączeń można odczytać z modelu przestrzennego lub z danych spektroskopowych.
3. Jeżeli występuje kilka odmian tautomerycznych, do obliczeń przyjmuje się odmianę najczęściej występującą.
4. Przeglądu wartości stałych dla składników należy dokonywać z należytą uwagą.

SPRAWOZDANIE

Jeżeli zastosowano metodę szacowania lub obliczeniową, sprawozdanie powinno zawierać, z uwzględnieniem zakresu przeprowadzonych badań, następujące informacje:

- opis substancji (mieszanina, zanieczyszczenia itp.),
- informacje o wiązaniach wodorowych w cząsteczce, o dysocjacji, ładunku i o innych nietypowych właściwościach,
- opis metody obliczeniowej,
- identyfikację lub załączenie bazy danych,
- cechy wyróżniające wybranych składników cząsteczki,
- zwięzłą dokumentację obliczeń.

¹⁾ Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

²⁾ C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).