

УДК [54.056+544.344.015.5.081.7]615.2/.3

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОЛА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ В СИСТЕМЕ ВОДА-1-ОКТАНОЛ

© 2005 О.С. Чернышева, А.С. Власенко, А.Ю. Куликов*,
Л.П. Логинова, Я.А. Атаманиченко

Определены константы распределения фенола, 4-гидроксibenзойной кислоты и ее метилового, этилового, пропилового и бутилового эфиров в системе вода-1-октанол при температуре 298.0 К, 303.0 К, 313.0 К и различном составе водной фазы, а также константа распределения 2-гидроксibenзойной кислоты при 298.0 К. Показано, что используя оценки $\lg P_{o/w}$ для описания данных хроматографического разделения в ВЭЖХ, влияние температуры и состава водной фазы на значения $\lg P_{o/w}$ можно не учитывать.

Параметры гидрофобности (липофильности) характеризуют перенос вещества через границу раздела фаз разной полярности и используются для описания распределения веществ в липидные бислои биомембран, описания неспецифического связывания растворенных веществ с биомакромолекулами, оценки биодоступности, активности и неспецифической токсичности многих лекарств и биологически важных соединений, при исследованиях соотношения структура-активность (QSAR) [1, 2]. С помощью параметров гидрофобности описывают и прогнозируют поведение веществ в условиях химического анализа, прежде всего хроматографического.

После того как Ганч [1, 2] выявил корреляцию между биологической активностью вещества и константой его распределения в системе вода-1-октанол ($P_{o/w}$), значения $\lg P_{o/w}$ стали использовать в качестве параметра гидрофобности. Выбор 1-октанола в качестве фазы сравнения основан на том, что баланс полярных и неполярных фрагментов в молекуле 1-октанола наилучшим образом имитирует дифильные свойства липидов и протеинов в клетках и тканях животных и растений [3].

Значения параметров гидрофобности $P_{o/w}$ веществ получают тремя основными методами [4-10]: 1) прямое определение экстракцией вещества в системе вода - 1-октанол; 2) косвенное определение, прежде всего методами хроматографии; 3) расчетные методы.

При очевидном преимуществе прямого метода его популярности среди исследователей мешают такие обстоятельства как длительность и трудоемкость эксперимента; большой расход веществ высокой степени чистоты; вероятность образования эмульсий при распределении, что искажает результаты [4, 5, 8, 9]. Дополнительные трудности возникают при контроле состава равновесной системы, когда концентрации вещества в двух фазах различаются на несколько порядков.

Косвенное определение $\lg P_{o/w}$ основано на корреляции между этой величиной и характеристиками удерживания в условиях разных видов хроматографического разделения [4 - 6, 8, 10]: высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), тонкослойной хроматографии (ТСХ), мицеллярной жидкостной хроматографии (МЖХ), мицеллярной электрокинетической хроматографии, центрифужной разделительной хроматографии. Для построения корреляционных соотношений необходимы данные о $\lg P_{o/w}$ модельных соединений; расчетные методы оценивания параметров гидрофобности нуждаются в тестировании также по известным значениям $\lg P_{o/w}$.

Косвенные хроматографические методы привлекают своей эффективностью; оказалось, однако, что получаемые оценки $\lg P_{o/w}$ зависят от разновидности хроматографического метода, режима элюирования (изократическое или градиентное), а также от наличия в водно-органическом элюенте компонентов рН-буферных систем [6]. Температура, при которой проводят разделения в ВЭЖХ, не всегда совпадает с условиями прямого определения $P_{o/w}$ в системе вода-1-октанол.

Для повышения точности косвенных методов и корректного сопоставления значений $\lg P_{o/w}$ необходимо установить, в какой степени температура и состав водной фазы могут влиять на оценки $\lg P_{o/w}$ прямым методом, что и составило цель данной работы.

*ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр»

Фенол и его производные (2- и 4-гидроксibenзойные кислоты и сложные эфиры последней) входят в состав многих практически важных веществ и материалов, широко используются в качестве модельных соединений и компонентов тестовых смесей в хроматографии, поэтому надежная оценка их характеристик гидрофобности представляет особый интерес. Имеющиеся для фенола литературные данные [2, 4, 6, 11-15] позволяют сопоставлять прямой и косвенные методы оценки $\lg P_{o/w}$. В нашей работе константы распределения фенола и его производных в системе вода-1-октанол определены при трех значениях температуры и четырех составах водной фазы. В качестве компонентов водной фазы выбраны реагенты, обычно входящие в состав элюентов для ВЭЖХ при рН 3: уксусно-ацетатный буфер, $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ –буфер и хлорная кислота.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и оборудование. Фенол, 2-гидроксibenзойная (салициловая) кислота, 4-гидроксibenзойная кислота (ГБК), метиловый, этиловый, пропиловый, бутиловый эфиры 4-гидроксibenзойной кислоты (метил-, этил-, пропил-, бутилпарабены) использовались в виде препаратов с массовой долей основного компонента 99-100 %.

1-Октанол квалификации «х.ч.» дополнительно очищали кипячением в течение двух часов с обратным холодильником с металлическим кальцием. Гидроксид кальция отфильтровывали, а 1-октанол перегоняли с нисходящим холодильником под вакуумом (8 мм). Для приготовления исходных растворов использовали ледяную уксусную кислоту, концентрированную ортофосфорную кислоту квалификации «ч.»; остальные используемые реактивы имели квалификацию «х.ч.». Дважды дистиллированную воду получали перегонкой дистиллированной воды в кварцевой посуде.

Установка для изучения распределения состояла из водяного термостата, 6 ячеек со стеклянными мешалками и электромеханического устройства для перемешивания. Температуру стабилизировали с погрешностью не выше ± 0.1 К. Спектрофотометрические определения выполнены на спектрофотометре СФ-46 или колориметре КФК-3. Для хроматографического анализа использован хроматограф Hewlett-Packard с колонкой Nucleosil 100-5 C_{18} , $150 \times 4,6$ мм с размером частиц сорбента 5 мкм, укомплектованный спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны; аналитические измерения проводились при $\lambda_{\text{ан}} = 200$ нм.

Значения рН определяли потенциометрически с помощью компенсационной схемы (потенциометр Р307, нуль-инструмент рН-метр-милливольтметр рН-120, электрод сравнения ЭВЛ-1М3, стеклянный электрод ЭСЛ-63-07). Стандартное отклонение измерений э.д.с. не превышало 0.3 мВ.

Условия эксперимента. В двухфазную систему в виде водных растворов вводили фенол ($1.0 \cdot 10^{-3}$ моль/л), 2-гидроксibenзойную кислоту ($1.0 \cdot 10^{-2}$ моль/л), 4-гидроксibenзойную кислоту ($9.0 \cdot 10^{-3}$ моль/л), метиловый эфир ГБК ($2.7 \cdot 10^{-3}$ моль/л) и этиловый эфир ГБК ($6.3 \cdot 10^{-3}$ моль/л). Пропиловый и бутиловый эфиры ГБК вводили в двухфазную систему в виде растворов в 1-октаноле с концентрациями $7.4 \cdot 10^{-2}$ моль/л и 0.25 моль/л соответственно. Распределение изучали при равных объемах водной и органической фаз (25.0 мл), выполняя 3-4 параллельных опыта. Перемешивание фаз в термостатированной ячейке длилось 1-2 часа, после чего отбирали аликвоту нижней водной фазы. Погружая пипетку в двухфазную систему, через нее осторожно продували воздух, чтобы предотвратить попадание в пипетку верхней органической фазы.

Содержание фенола в водной фазе после распределения определяли спектрофотометрически по поглощению окрашенного продукта с 4-аминоантипирином [16] в щелочной среде при длине волны 500 нм. Салициловую (2-гидроксibenзойную) кислоту определяли по образованию комплекса с ионами железа (III) с максимумом поглощения света при длине волны 525 нм. При использовании методики, описанной в [17], градуировочный график отклонялся от линейности; для устранения отклонений увеличили в 2 раза количество добавляемого раствора соли железа (III). Методика непригодна в присутствии фосфатного буфера, поскольку комплексы Fe^{3+} с анионами H_2PO_4^- и гидросалицилата близки по устойчивости: $\lg K [\text{FeH}_2\text{PO}_4^{2+}] = 3.47$, $\lg K [\text{FeHSal}^{2+}] = 4.40$ [18].

Метиловый и этиловый эфиры 4-гидроксibenзойной кислоты в водной фазе после распределения определяли по собственному поглощению при длине волны 256 нм, более гидрофобные

пропиловый и бутиловый эфиры определяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. В качестве элюента использован водный раствор ацетонитрила с объемной долей последнего 40 %; объем вводимой пробы 100 мкл, температура колонки 303 К.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 обобщены литературные данные о значениях $\lg P_{o/w}$ фенола и его производных. В таблицу не включали значения $\lg P_{o/w}$ при 298 К, приведенные в [13] без ссылки на источник. Сопоставление результатов, полученных для фенола прямым и косвенным методами, показывает, что методы ВЭЖХ дали заниженные оценки $\lg P_{o/w}$ [6], заниженные оценки получены и для некоторых других соединений, исследованных в той же работе. Вместе с тем данные ВЭЖХ [6] относятся к более высокой температуре, а состав водно-органического элюента отличается от состава водной фазы при исследовании распределения прямым методом, что может быть причиной расхождений в оценках $\lg P_{o/w}$.

Точность определения констант распределения зависит от точности определения концентраций в равновесной двухфазной системе; трудности определения малых концентраций возникают при высокой гидрофобности или высокой гидрофильности вещества. С учетом диапазонов концентраций, определяемых методами спектрофотометрии и ВЭЖХ, можно выделить 4 группы веществ в соответствии с 4 разновидностями методик изучения распределения в системе вода – 1-октанол.

1. Для веществ с $0 < \lg P_{o/w} < 2$ необходим контроль состава водной фазы; пригоден метод спектрофотометрии.
2. Для веществ с $-2 < \lg P_{o/w} < 0$ методом спектрофотометрии необходимо контролировать состав органической фазы.
3. Для веществ с $\lg P_{o/w} > 2$ необходим контроль состава водной фазы методом ВЭЖХ.
4. При $\lg P_{o/w} < -2$ методом ВЭЖХ необходимо контролировать концентрацию вещества в органической фазе.

Фенол, 2- и 4-гидроксibenзойные кислоты, метиловый эфир 4-гидроксibenзойной кислоты относятся к группе 1, остальные эфиры ГБК — к группе 2.

Таблица 1. Литературные данные о константах ионизации (K_a) и константах распределения ($P_{o/w}$) фенола и его производных

Вещество	pK_a	$\lg P_{o/w}$	Метод определения, условия	Литература
Фенол	9.95 [19]	1,48	-	[2]*
		1,50	Экстракция, 293±2 К, pH 2-3	[20]
		0.87	ВЭЖХ, 303 К, pH 7.27, подвижная фаза ацетонитрил-вода, фосфатный буфер	[6]
		0.94		
2-гидроксibenзойная (салициловая) кислота	$pK_{a1} = 2.97$ $pK_{a2} = 13.39$ [19]	2.26	Экстракция, УФ СФ	[21]
		2.21	-	[2]*
4-гидроксibenзойная кислота (ГБК)	$pK_{a1} = 4.58$ $pK_{a2} = 9.13$ [19]	1.58	-	[22]**
Метиловый эфир ГБК	8.47 [23]	1.96	-	[1, 2]*
		1.99	pH 5.6, фосфатный буфер	[24]***
		1.92	-	[1]***
Этиловый эфир ГБК	8.47 [23]	2.47	-	[1, 2]*
		2.35	pH 5.6, фосфатный буфер	[24]***
Пропиловый эфир ГБК	8.14 [23]	3.04	-	[1, 2]*
Бутиловый эфир ГБК	-	3.57	-	[1, 2]*

* значения приведены в [2] со ссылкой на неопубликованные результаты.

** цитируется по [2].

***цитируется по материалам ACDlab.

Фенол и эфиры 4-гидроксibenзойной кислоты в условиях распределения диссоциированы в ничтожно малой степени, поэтому их константы распределения находили как коэффициенты распределения по уравнению:

$$P_{ow} = \frac{c_o'}{c_w'} = \frac{c_w - c_w'}{c_w'} \quad (1)$$

где c_o' и c_w' — концентрации распределяемого вещества в органической и водной фазах соответственно после распределения, c_w — начальная концентрация распределяемого вещества в водной фазе, или по уравнению:

$$P_{ow} = \frac{c_o'}{c_w'} = \frac{c_o - c_w'}{c_w'} \quad (2)$$

где c_o — начальная концентрация распределяемого вещества (пропилового и бутилового эфира) в органической фазе.

2-гидроксibenзойная кислота при pH 3 частично диссоциирована, и правая часть уравнения (1) представляет собой ее коэффициент распределения D. Константу распределения 2-гидроксibenзойной кислоты для всех систем рассчитывали по уравнению:

$$P_{ow} = K_D^c = D(1 + K_{a1}10^{pH} + K_{a1}K_{a2}10^{2pH}), \quad (3)$$

измеряя pH водной фазы и используя литературные значения констант диссоциации (табл. 1).

Для более слабой 4-гидроксibenзойной кислоты значение коэффициента распределения при pH 3 и температуре 298.0 K практически равно константе распределения (табл. 2).

Таблица 2. Характеристики распределения веществ в системе вода-1-октанол (стандартное отклонение $\lg P_{ow}$ не превышает 0.02)

Вещество	Состав водной фазы	$\lg P_{ow}$		
		298.0 K	303.0 K	313.0 K
Фенол	Вода	1.52	1.53	1.51
	pH 3, уксусно-ацетатный буфер	1.56	1.50	1.56
	pH 3, фосфатный буфер	1.67	1.68	1.64
	$1.1 \cdot 10^{-3}$ моль/л HClO_4	1.50	1.49	1.49
2-гидроксibenзойная кислота уравн.(3)	I = 0.5 моль/л (NaCl), pH 2.00 – 3.80(хлороводородная кислота, формиатный буфер)	2.17	-	-
	I = 0, pH 1.89 – 3.60 (хлороводородная кислота, формиатный буфер)	2.27	-	-
4-гидроксibenзойная кислота, уравн.(1)	pH 3, уксусно-ацетатный буфер	1.59*	1.31*	1.29*
	pH 3, фосфатный буфер	1.66*	1.44*	1.34*
	$1.1 \cdot 10^{-3}$ моль/л HClO_4	1.51*	1.35*	1.27*
4-гидроксibenзойная кислота, уравн.(3)	I = 0.5 моль/л (NaCl), pH 3.72 – 5.06 (ацетатный буфер)	1.46	-	-
Метилловый эфир ГБК	Вода	1.95	1.95	1.88
	pH 3, уксусно-ацетатный буфер	1.94	1.85	1.83
	pH 3, фосфатный буфер	1.98	1.98	1.91
	$1.1 \cdot 10^{-3}$ моль/л HClO_4	1.96	1.92	1.91
Этиловый эфир ГБК	Вода	2.44	2.43	2.38
	pH 3, уксусно-ацетатный буфер	2.40	2.35	2.32
	pH 3, фосфатный буфер	2.47	2.40	2.34
	$1.1 \cdot 10^{-3}$ моль/л HClO_4	2.44	2.42	2.33
Пропиловый эфир ГБК	Вода	3.04	3.03	2.87
	pH 3, уксусно-ацетатный буфер	2.94	2.92	2.73
	pH 3, фосфатный буфер	3.06	3.02	2.94
	$1.1 \cdot 10^{-3}$ моль/л HClO_4	3.03	3.00	2.97

Таблица 2. Продолжение

Бутиловый эфир ГБК	Вода	3.60	3.57	3.47
	pH 3, уксусно-ацетатный буфер	3.56	3.56	3.41
	pH 3, фосфатный буфер	3.61	3.54	3.50
	$1.1 \cdot 10^{-3}$ моль/л HClO_4	3.50	3.45	3.39

* приведены значения $\lg D$, где D — коэффициент распределения.
I — ионная сила.

Полученные экспериментальные значения $\lg P_{o/w}$ для исследуемых веществ хорошо согласуются с литературными данными, полученными таким же методом. Температурный ход значений $\lg P_{o/w}$ не превышает 0.2. Исключение составляют коэффициенты распределения 4-гидроксibenзойной кислоты, значения которых заметно уменьшаются с ростом температуры. Этот эффект нельзя объяснить усилением диссоциации 4-гидроксibenзойной кислоты, поскольку, судя по литературным данным, при 298 К и 318 К значения константы диссоциации почти одинаковы ($pK_{a1} = 4.50$ и 4.42 соответственно [19, 25]).

При варьировании состава водной фазы значения $\lg P_{o/w}$ (табл. 2) каждого реагента изменяются в пределах 0.1. Более низкие значения $\lg P_{o/w}$, как правило, наблюдаются в присутствии уксусно-ацетатного буферного раствора.

По экспериментальным данным о $\lg P_{o/w}$ этилового, пропилового и бутилового эфиров ГБК и значениям факторов удерживания k эфиров в условиях хроматографирования получены уравнения регрессии вида

$$\lg P_{ow} = a + b \lg k. \tag{4}$$

Пример зависимости (4) приведен на рис. 1; пунктирными линиями обозначены границы доверительных интервалов регрессии при доверительной вероятности 0.95.

Как видно из рис. 1, при построении линейной регрессии по 3 точкам погрешности аппроксимации превышают эффекты влияния температуры и состава водной фазы на значения $\lg P_{o/w}$. В пределах веществ одного гомологического ряда трудно получить более узкий доверительный интервал регрессии: чем больше различаются значения факторов удерживания первого и последнего гомологов, тем труднее для них обеспечить равнозначность определения. С другой стороны, построение регрессии по данным для веществ, не относящихся к одному гомологическому ряду, осложняется дополнительным расхождением между данными для разных классов соединений. Таким образом, используя оценки $\lg P_{o/w}$ для описания данных хроматографического разделения в ВЭЖХ, влияние температуры и состава водной фазы (в изученных пределах) на значения $\lg P_{o/w}$ можно не учитывать.

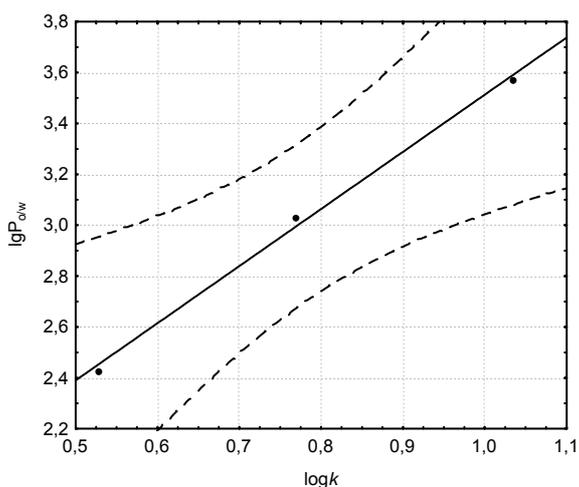


Рис. 1. Зависимость логарифма константы распределения в системе вода-1-октанол (водная фаза — вода, 303 К) от логарифма фактора удерживания этилового, пропилового и бутилового эфиров ГБК.

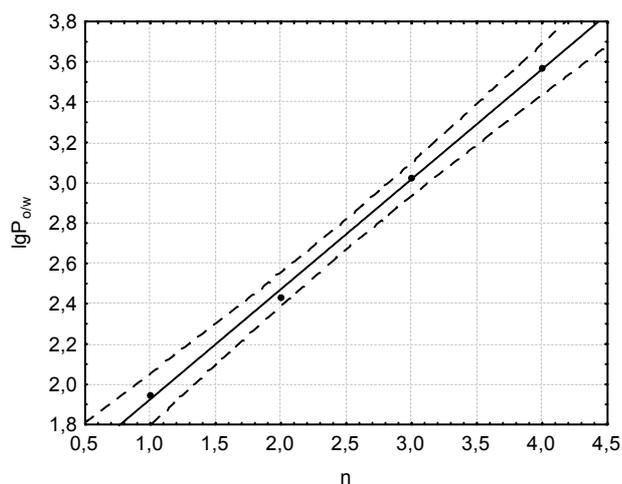


Рис. 2. Зависимость логарифма константы распределения эфиров ГБК в системе вода-1-октанол (водная фаза — вода, 303 К) от числа атомов углерода в углеводородном радикале.

Зависимость $\lg P_{o/w}$ от числа атомов углерода в углеводородном радикале эфиров 4-гидроксibenзойной кислоты характеризуется более узкими доверительными интервалами (рис.2). Здесь для построения регрессии целесообразно использовать оценки $\lg P_{o/w}$, полученные при одинаковой температуре и составе водной фазы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hanch C., Leo A. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. Wiley-Interscience: New York. 1979.
2. Leo A., Hansch C. Chem. Rev. 1971. V.171. No.6. P. 525.
3. Valsaraj K.T., Thibodeaux L.J. Sep. Sci. Tech. 1990. V.25. No.4. P. 369-395.
4. Trone M.D., Leonard M.S., Khaledi M.G. Anal. Chem. 2000. V.72. P. 1228-1235.
5. Poole S.K., Poole C.F. J. Chromatogr. B. 2003. V.797. P. 3-19.
6. Kaune A., Knorrenschild M., Kettrup A. Fresenius J. Anal. Chem. 1995. V.352. P. 303-312.
7. Leo A. Chem. Rev. 1993. No.4. P. 1281-1307.
8. Nahum A., Horvath C. J. Chromatogr. 1980. V.192. P. 315-322.
9. Gulyaeva N., Zaslavsky A. J. Chromatogr. B. 2000. V.743. P. 187 - 194.
10. Pekker R. The hydrophobic fragmental constants. Amsterdam -Oxford -New York, Elsevier scientific publishing company. -1977. - P. 1 -22.
11. Коренман Я.И. Журн. ан. химии. 2002. Т.57. № 10. С. 1064-1071.
12. Коренман Я.И. Журн. прикл. химии. 1983. Т.56. № 6. С. 1410-1413.
13. Коренман Я.И. Коэффициенты распределения органических соединений. Воронеж: Изд-во ВГУ, 1992. 336 с.
14. Коренман Я.И. Журн. физ. химии. 1983. Т.57. № 6. С. 1533-1536.
15. Abraham M.H., Treiner C., Roses M., Rafols C., Ishihama Y. J.Chromatogr. A. 1996. V.752. P. 243-249.
16. Инструментальные методы анализа функциональных групп органических соединений. Под ред. С. Сиггиа. М.: Мир, 1974. С. 464.
17. British Pharmacopoeia 1992. Effective date: 1.12.93. - HMSO - 1993. V. 1, 2.
18. Бугаевський А.А., Решетняк О.О. Таблиці констант хімічних рівноваг, що застосовуються у аналітичній хімії/ Харків: ХНУ, 2000. - 77 с. Укр. мовою.
19. Kortüm G., Vogel W., Andrussov K. Pure Appl. Chem. 1961. V.1. No. 2-3. P. 373-375, 428-429, 458-460, 632.
20. Коренман Я. И. Экстракция фенолов. Горький: Волгоятское книжное издательство, 1973. - 216 с.
21. Hansch C., Anderson M. J. Org. Chem. 1967. V.32. P. 2583-2586.
22. Fujita T., Iwasa J., Hansch C. J.Amer.Chem.Soc. 1964. V.86. P. 5175-5180.
23. Freese E., Levin B.C., Pearce R. Teratology. 1979. V.20. P. 413.
24. Umeyama H., Nagai T., Nogami H. Chem. Pharm. Bull. Jap. 1971. V.19. P. 1714.
25. Hermans J., Leach S.J., Sheraga H.A. J. Amer. Chem. Soc. 1963. V.85. P. 1390.

Поступила в редакцию 3 августа 2005 г.

Kharkov University Bulletin. 2005. №669. Chemical Series. Issue 13(36). Loginova L.P., Chernysheva O.S., Vlasenko A.S., Kulikov A.Yu., Atamanichenko Ya.A. Phenol and its derivatives partitioning in 1-octanol - water system.

Partition coefficients of phenol, 4-hydroxybenzoic acid and its methyl, ethyl, propyl and butyl esters in 1-octanol - water system at 298.0, 303.0, 313.0 K with different composition of the aqueous phase were determined. Partition coefficient of 2-hydroxybenzoic acid at 298.0 K was also defined. It was shown that influence of temperature and water phase composition on $\lg P_{o/w}$ values that used for the description of chromatographic separation in HPLC could not be taken into account.