



Uniwersytet
Gdański



Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku



Katedra Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie 1

Procedury wyodrębniania, wzbogacania, wykrywania i oznaczania śladowych zanieczyszczeń w różnych komponentach środowiska

Gdańsk, 2023



Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku

Procedury wyodrębniania, wzbogacania, wykrywania i oznaczania śladowych zanieczyszczeń w różnych komponentach środowiska

Cel ćwiczenia

Ćwiczenie 1 jest ćwiczeniem dyskusyjno-obliczeniowym mającym na celu powtórzenie zagadnień i usystematyzowanie wiedzy z zakresu analityki środowiska. Wykonanie zadań zaplanowanych w ramach tego ćwiczenia jest podstawą do poprawnego przeprowadzenia eksperymentów i interpretacji otrzymanych wyników w późniejszych etapach zajęć laboratoryjnych.

Student zobowiązany jest przynieść wydrukowaną instrukcję z Ćwiczenia 1 na pierwsze zajęcia laboratoryjne z przedmiotu Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku.

1. Śladowe zanieczyszczenia

a) Co się kryje pod pojęciem „śladowe” zanieczyszczenia?

b) Jak inaczej nazywane są obecnie śladowe zanieczyszczenia środowiska?

c) Podaj po 3 przykłady zanieczyszczeń:

powietrza:

gleby:

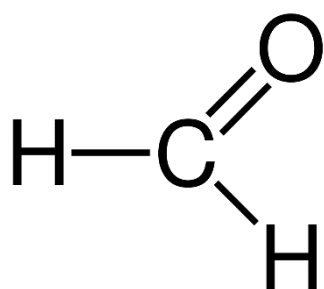
wody:



Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku

Procedury wyodrębniania, wzbogacania, wykrywania i oznaczania śladowych zanieczyszczeń w różnych komponentach środowiska

d) Na podstawie właściwości fizykochemicznych oraz struktury poniższych zanieczyszczeń środowiska, określ który z podanych związków chemicznych będzie miał największe prawdopodobieństwo skażenia powietrza, wody lub gleby.



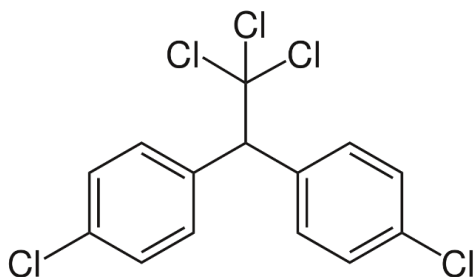
Aldehyd mrówkowy, formaldehyd

Masa molowa: 30,031 g/mol

Temperatura wrzenia: -19 °C

Log K_{ow} : 0,35

Największe prawdopodobieństwo skażenia przez formaldehyd.



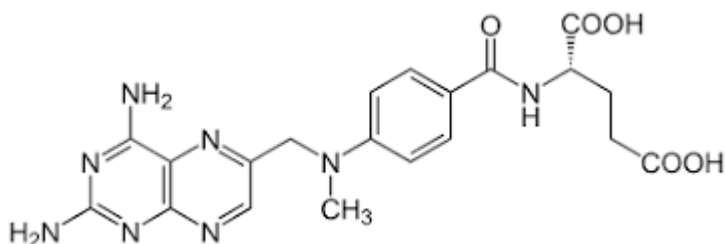
Dichlorodifenylotrichloroetan (DDT), insektycyd

Masa molowa: 354,49 g/mol

Temperatura wrzenia: 260 °C

Log K_{ow} : 6,2

Największe prawdopodobieństwo skażeniaprzez DDT.



Metotreksat, lek przeciwnowotworowy

Masa molowa: 454,4 g/mol

Temperatura wrzenia: 561 °C

Log K_{ow} : -1,85

Największe prawdopodobieństwo skażenia przez metotreksat.



Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku

Procedury wyodrębniania, wzbogacania, wykrywania i oznaczania śladowych zanieczyszczeń w różnych komponentach środowiska

2. Metody wyodrębniania i wzbogacania zanieczyszczeń z próbek środowiskowych

- a) Co oznacza wyodrębnianie związku chemicznego z matrycy próbki?
- b) Co oznacza wzbogacanie związku chemicznego w kontekście przygotowywania próbek do analizy instrumentalnej?
- c) Zaproponuj metodę wyodrębniania i wzbogacania dieldryny (insektycyd) z gleby.

Właściwości związku chemicznego:

Masa molowa: 380,91 g/mol

Temperatura wrzenia: 385 °C

Log K_{ow} : 5,7

- d) Zaproponuj metodę wyodrębniania i wzbogacania metronidazolu (farmaceutyk) z wody.

Właściwości związku chemicznego:

Masa molowa: 171,15 g/mol

Temperatura wrzenia: 301 °C

Log K_{ow} : -0,02

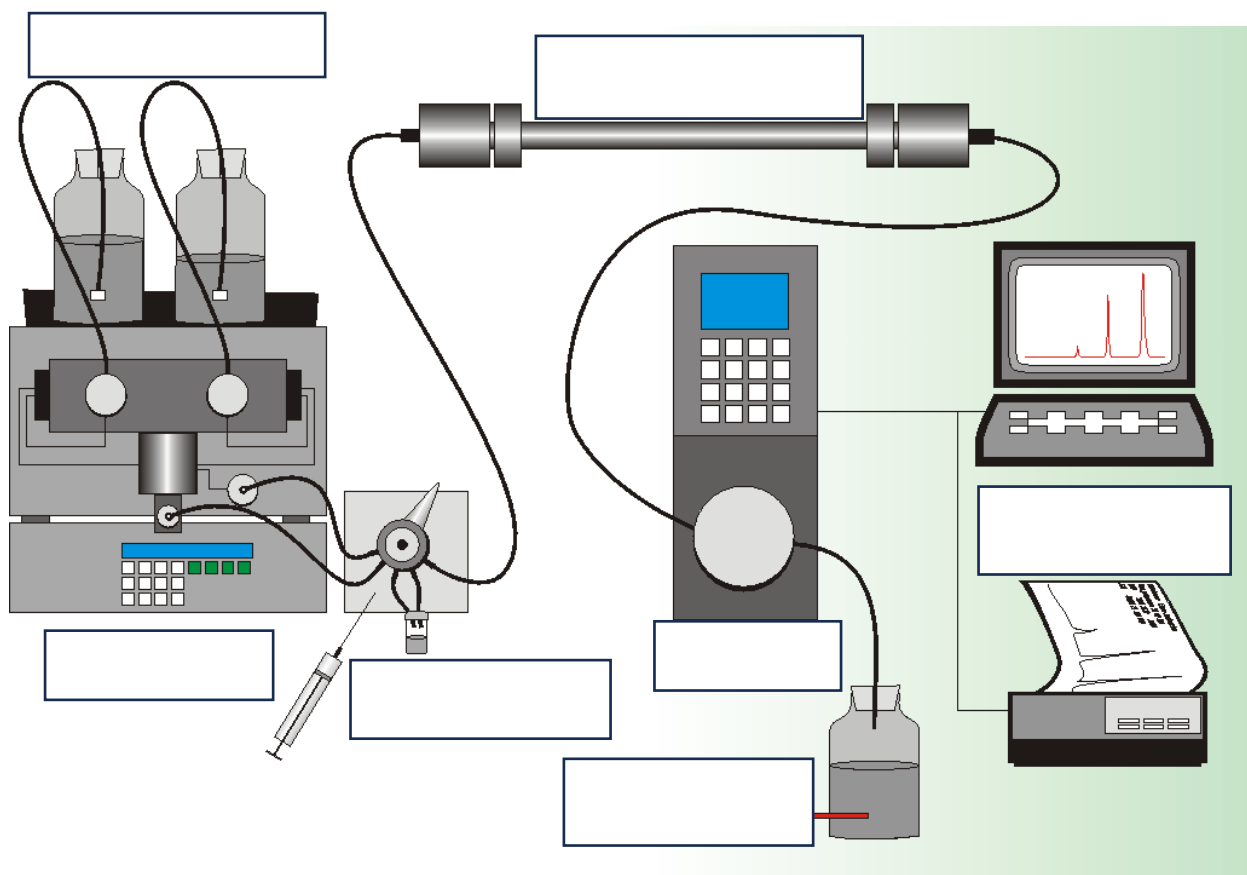
Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku

Procedury wyodrębniania, wzbogacania, wykrywania i oznaczania śladowych zanieczyszczeń w różnych komponentach środowiska

3. Wykrywanie śladowych zanieczyszczeń w środowisku

3.1. Chromatografia cieczowa

a) Podpisz elementy schematu chromatografu cieczowego i zaznacz kierunek przepływu fazy ruchomej.



b) Podaj po jednym przykładzie fazy ruchomej i fazy stacjonarnej stosowanych w chromatografii cieczowej.

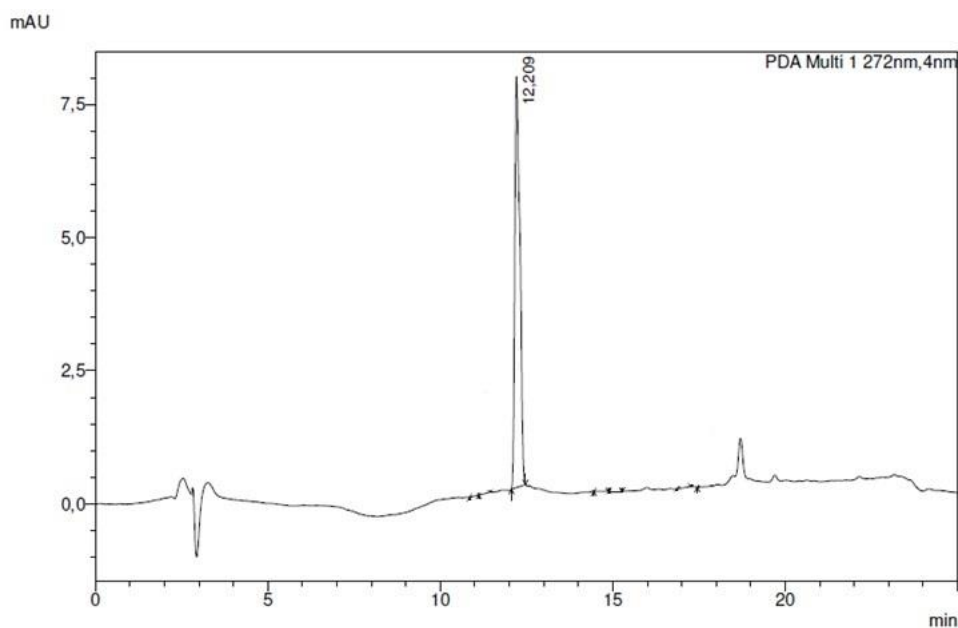
c) Do laboratorium przywieziono dwie próbki wody, jedną z rzeki (500 ml) prawdopodobnie skażonej wyciekami ścieków z kanalizacji szpitalnej a drugą ze stawu (500 ml) sąsiadującego ze szpitalem. Zlecono analizę danych próbek w celu sprawdzenia skażenia ibuprofenem i paracetamolem. Przywiezione próbki przygotowano do analizy instrumentalnej poprzez ekstrakcję do fazy stałej i zateżenie z 500 ml do 1 ml. Wykonano analizy chromatograficzne próbek



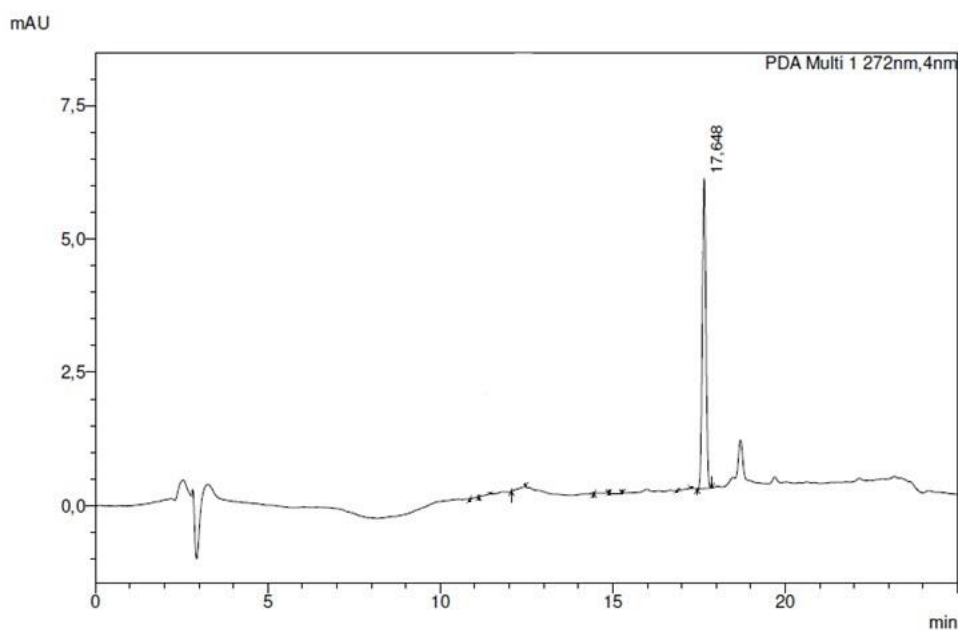
Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku

Procedury wyodrębniania, wzbogacania, wykrywania i oznaczania śladowych zanieczyszczeń w różnych komponentach środowiska

wzorcowej ibuprofenu (**Rys. 1**) oraz paracetamolu (**Rys. 2**) a następnie analizy chromatograficzne próbki pobranej z rzeki (**Rys. 3**) oraz próbki pobranej ze stawu (**Rys. 4**).



Rys. 1 Chromatogram uzyskany z analizy roztworu wzorcowego ibuprofenu

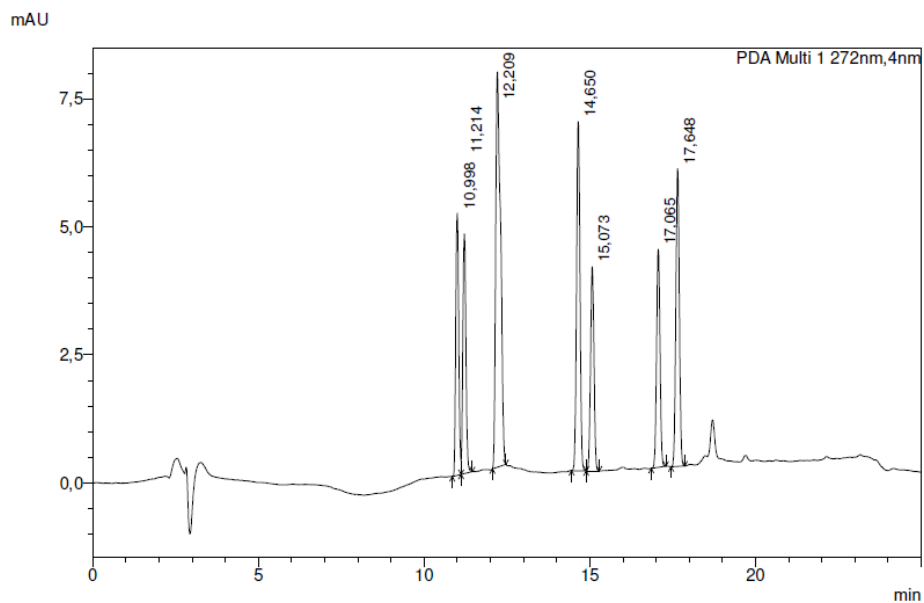


Rys. 2 Chromatogram uzyskany z analizy roztworu wzorcowego paracetamolu

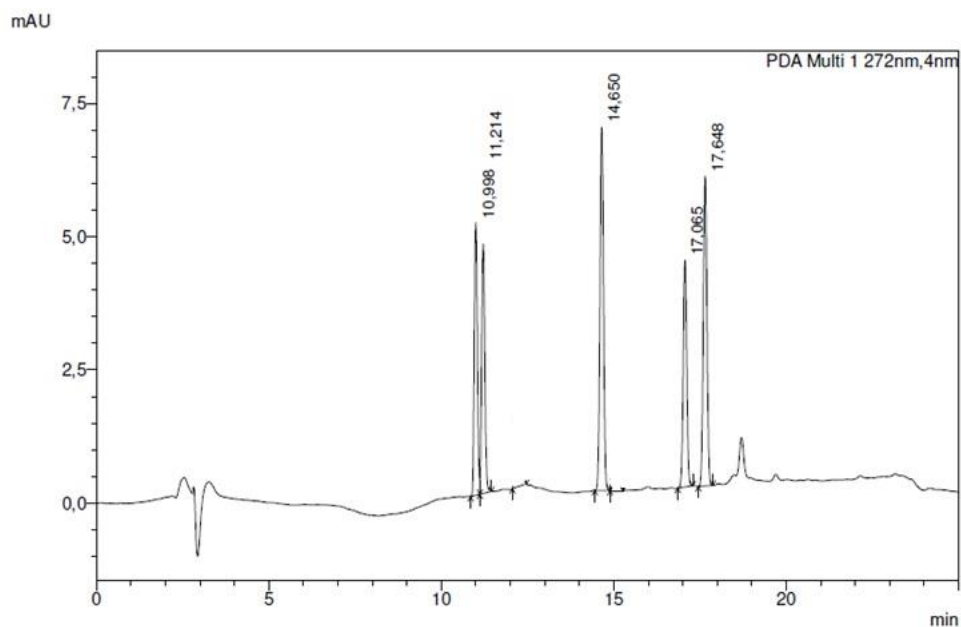


Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku

Procedury wyodrębniania, wzbogacania, wykrywania i oznaczania śladowych zanieczyszczeń w różnych komponentach środowiska



Rys. 3 Chromatogram uzyskany z analizy ekstraktu z próbki wody z rzeki



Rys. 4 Chromatogram uzyskany z analizy ekstraktu z próbki wody ze stawu

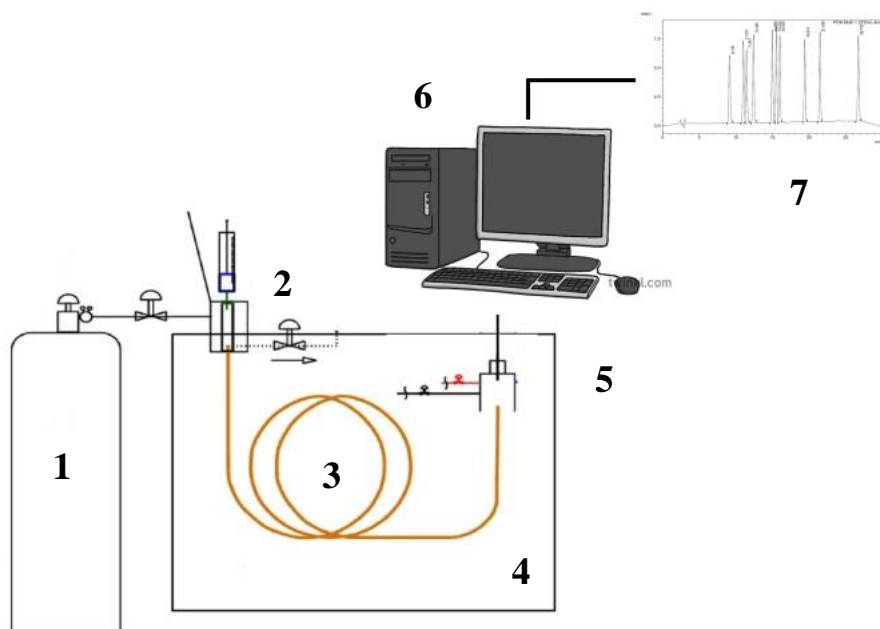
Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku

Procedury wyodrębniania, wzbogacania, wykrywania i oznaczania śladowych zanieczyszczeń w różnych komponentach środowiska

Czy w badanych próbkach wykryto ibuprofen oraz paracetamol? Jeśli tak to jaki parametr służy do identyfikacji związków chemicznych w chromatografii?

3.2. Chromatografia gazowa

a) Podpisz elementy schematu chromatografu gazowego i zaznacz kierunek przepływu fazy ruchomej.



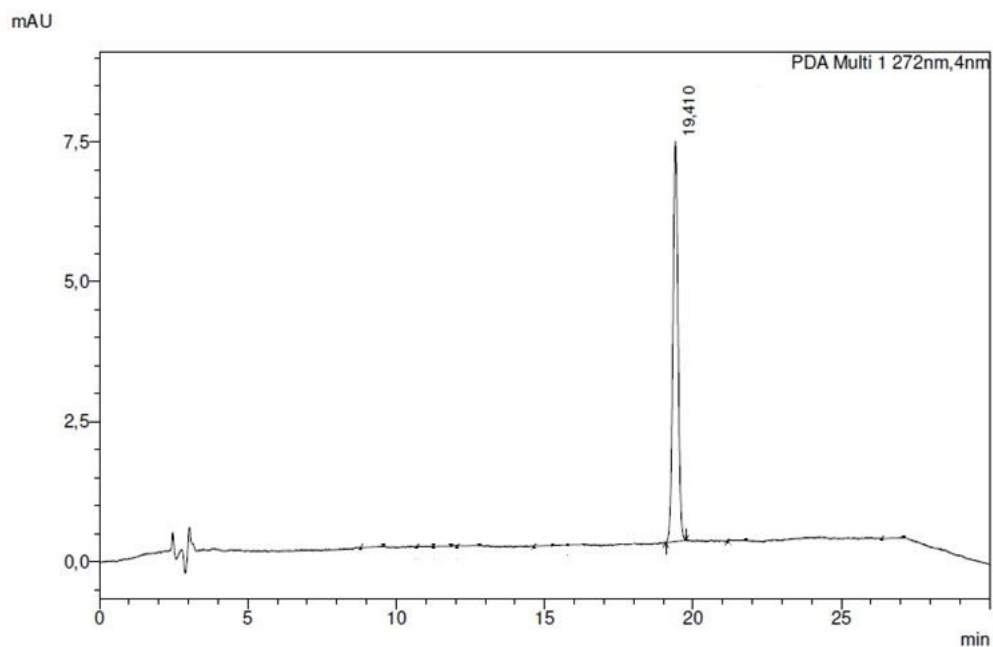
b) Podaj po jednej fazie ruchomej i fazie stacjonarnej stosowanej w chromatografii gazowej

c) Do laboratorium przywieziono próbkę gleby prawdopodobnie skażonej wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (WWA) ze względu na bliskie sąsiedztwo z ruchliwą drogą wojewódzką. Zlecono analizę danej próbki w celu potwierdzenia obecności antracenu i fenantrenu. Przywiezioną próbkę przygotowano do analizy instrumentalnej poprzez ekstrakcję rozpuszczalnikiem wspomaganą ultradźwiękami. Wykonano analizy chromatograficzne próbki wzorcowej antracenu (**Rys. 5**) oraz fenantrenu (**Rys. 6**) a następnie analizy chromatograficzne ekstraktu z próbki gleby (**Rys. 7**).

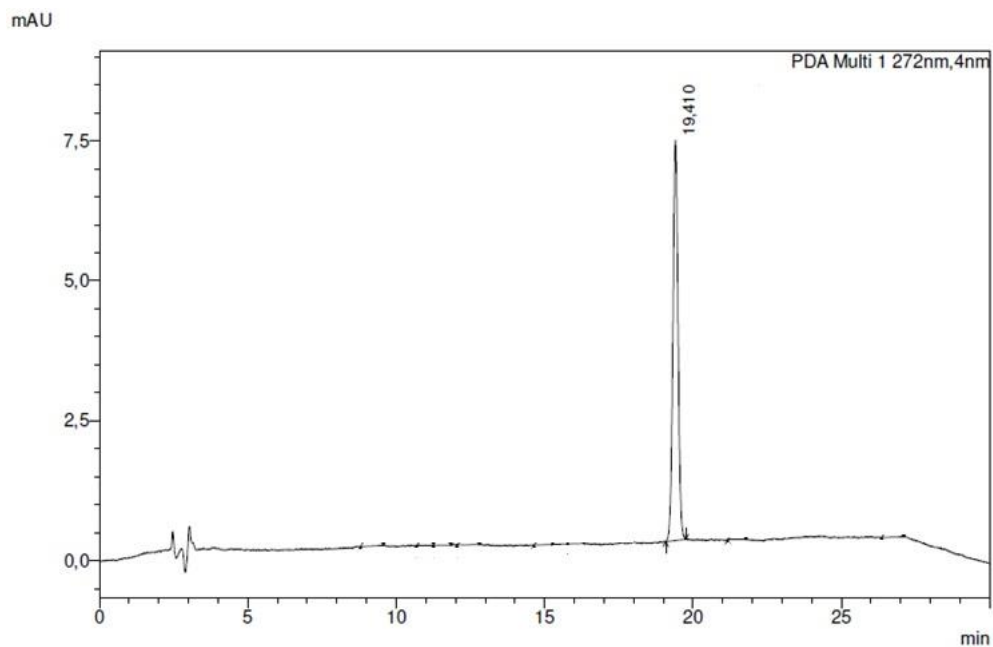


Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku

Procedury wyodrębniania, wzbogacania, wykrywania i oznaczania śladowych zanieczyszczeń w różnych komponentach środowiska



Rys. 5 Chromatogram otrzymany z analizy roztworu wzorcowego antracenu

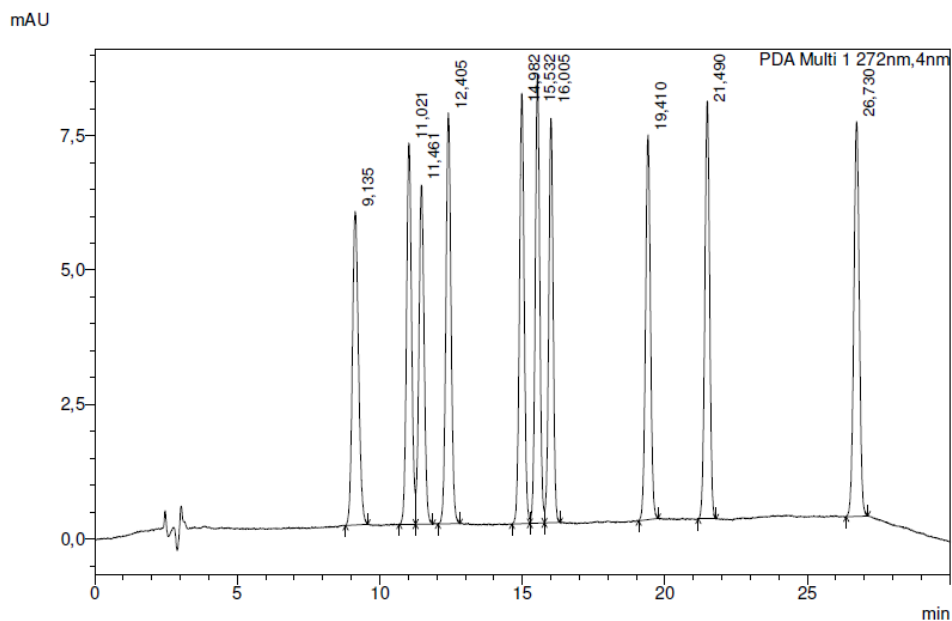


Rys. 6 Chromatogram otrzymany z analizy roztworu wzorcowego fenantrenu



Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku

Procedury wyodrębniania, wzbogacania, wykrywania i oznaczania śladowych zanieczyszczeń w różnych komponentach środowiska



Rys. 7 Chromatogram otrzymany z analizy ekstraktu z próbki gleby

Czy na podstawie uzyskanych wyników możliwe jest potwierdzenie lub też zaprzeczenie obecności antracenu i fenantrenu w próbce gleby? Jeśli tak to na podstawie jakiego parametru jest możliwa analiza jakościowa w chromatografii gazowej? Jeśli nie podaj propozycję co można zmienić, żeby umożliwić analizę jakościową?

3.3. Spektrofotometra UV-Vis

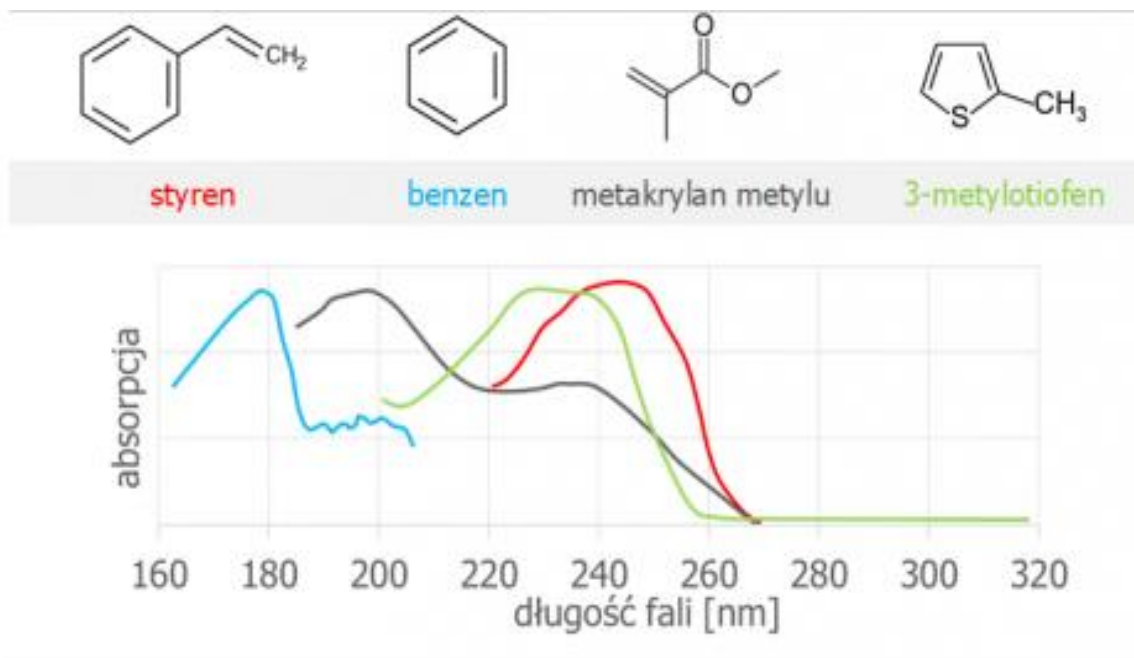
a) Wyjaśnij różnicę między adsorpcją a absorpcją?

b) Co oznacza UV-Vis?

c) Co to jest grupa chromoforowa? Podaj przykład.

Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku

Procedury wyodrębniania, wzbogacania, wykrywania i oznaczania śladowych zanieczyszczeń w różnych komponentach środowiska



d) Na podstawie powyższych widm absorpcji otrzymanych z analizy spektrofotometrycznej UV-Vis, określ optymalne długości fali dla podanych związków chemicznych, przy których należy wykonywać pomiar absorbancji w dalszych etapach analizy spektrofotometrycznej.

4. Metody oznaczania śladowych zanieczyszczeń w środowisku

4.1. Oznaczanie zawartości żelaza w próbkach wody metodą krzywej kalibracyjnej za pomocą spektrofotometrii UV-Vis

a) Do oznaczania ogólnej zawartości żelaza zastosowanie znajduje metoda kolorymetryczna, która polega na redukcji jonów Fe^{3+} do Fe^{2+} za pomocą hydroksylaminy i przeprowadzeniu reakcji barwnej z fenantroliną. Jony Fe^{2+} tworzą z tym związkiem pomarańczowy kompleks. Intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do stężenia żelaza w próbce i oznaczana jest spektrofotometrycznie metodą krzywej kalibracyjnej.

Przeprowadzono pomiar absorbancji roztworów żelaza o znanym stężeniu (od 0 do 8 $\mu\text{g/ml}$) oraz próbki wody z rzeki (x), próbki wody z jeziora (y) oraz próbki wody z morza (z), w których należy oznaczyć jego zawartość. Wyniki zestawiono w Tabeli 1. Wykreśl krzywą kalibracyjną na



Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku

Procedury wyodrębniania, wzbogacania, wykrywania i oznaczania śladowych zanieczyszczeń w różnych komponentach środowiska

podstawie danych zestawionych w Tabeli 1 i oblicz zawartości żelaza w próbkach analizowanych wód metodą krzywej kalibracyjnej.

Tabela 1 Wyniki pomiaru absorbancji w zależności od zawartości żelaza w próbce

Stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	Absorbancja
0	Ślepa próba
0,4	0,003
0,8	0,007
1,6	0,015
4	0,038
8	0,054
x	0,026
y	0,081
z	0,002

Równanie krzywej kalibracyjnej:

Stężenia żelaza w badanych wodach:

Czy możliwe jest obliczenie zawartości żelaza we wszystkich badanych próbkach? Jeśli nie zaproponuj działania, które umożliwią wyznaczenie stężenia żelaza w próbkach.



Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku

Procedury wyodrębniania, wzbogacania, wykrywania i oznaczania śladowych zanieczyszczeń w różnych komponentach środowiska

4.2. Oznaczanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) metodą wzorca wewnętrznego za pomocą chromatografii gazowej (GC)

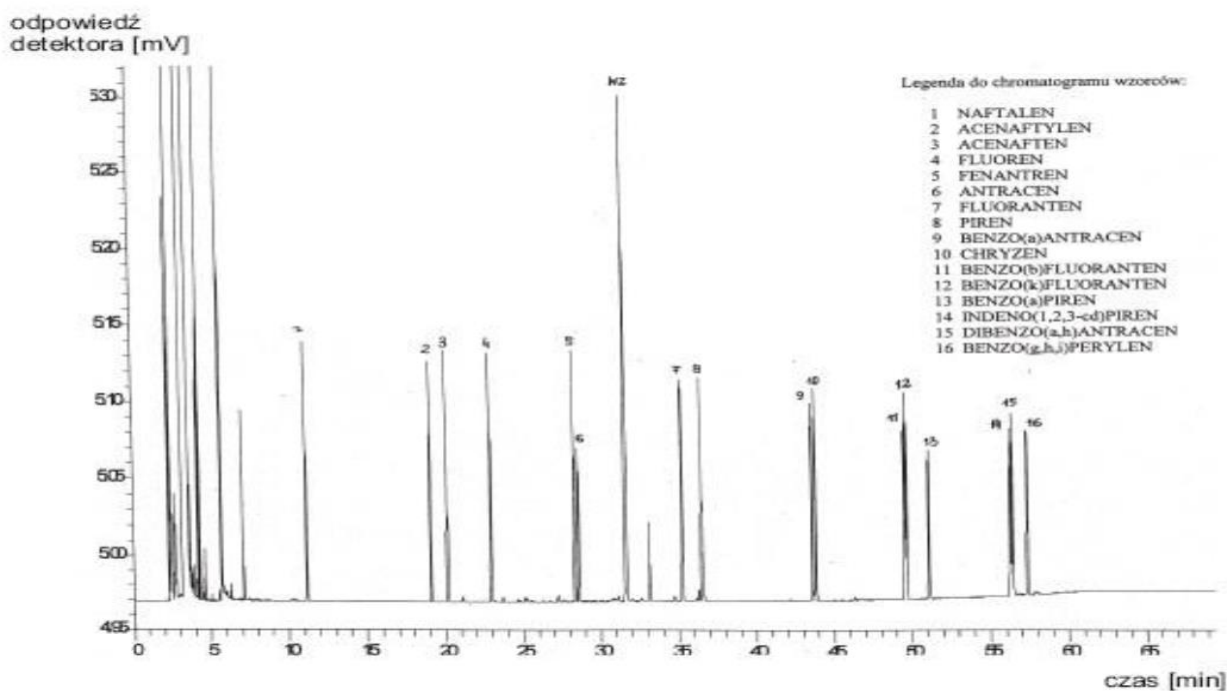
a) Jednym z podejść do oznaczania ilościowego WWA w wodzie metodą wzorca wewnętrznego jest wyizolowanie frakcji węglowodorów z próbki wody metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) a następnie oznaczenie ich zawartości w wodzie techniką chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC/FID). Etapy procedury:

- odmierzenie próbki wody (250 ml),
- dodanie odpowiedniej objętości roztworu wzorca wewnętrznego (9-metyloantracenu o stężeniu $128 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) do próbki analitycznej,
- ekstrakcja do fazy stałej i elucja 1 ml dichlorometanu,
- analiza GC/FID roztworu kalibracyjnego wzorców WWA i wzorca wewnętrznego (stężenie $12 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) oraz analiza ekstraktu z próbki wody.

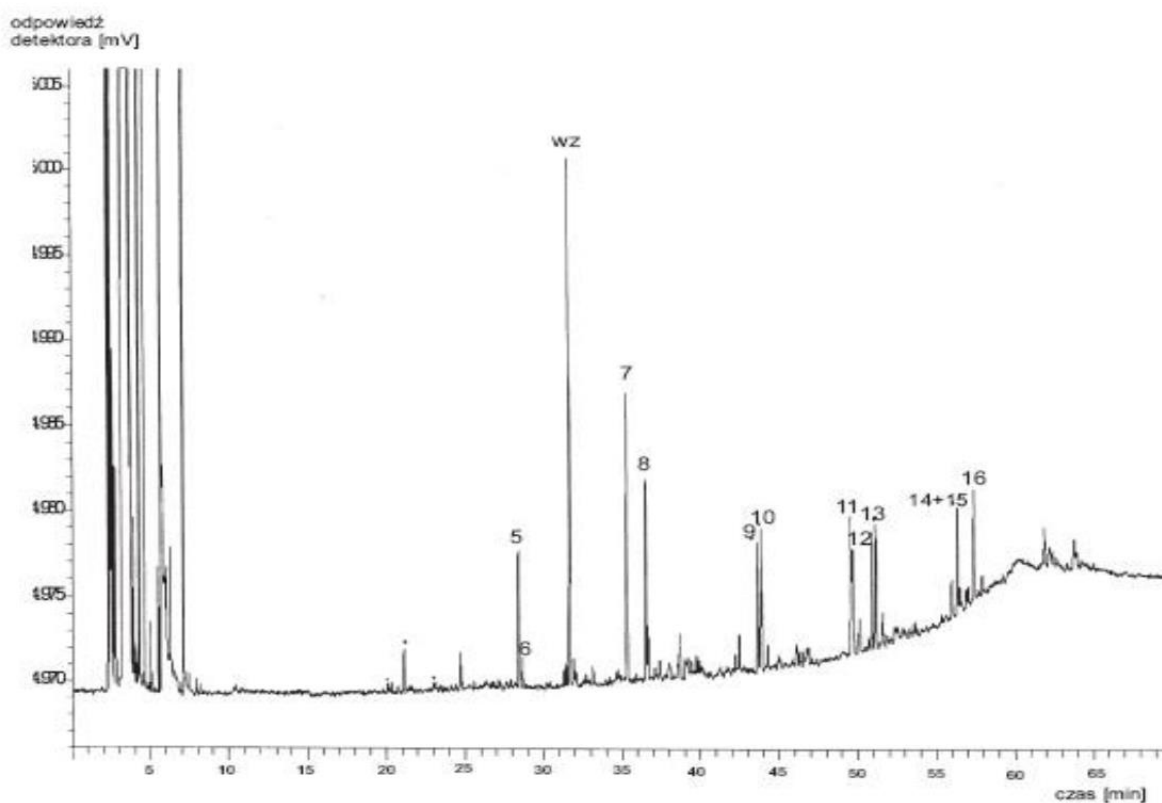
a) oblicz objętość roztworu wzorca wewnętrznego o stężeniu $128 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ jaką powinno się dodać do 250 ml próbki wody wiedząc, iż ilość wzorca w próbce powinna być ~2 razy większa niż analitu. Zakłada się, że stężenie poszczególnych WWA w wodzie wynosi ~0,65 ppm.

Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku

Procedury wyodrębniania, wzbogacania, wykrywania i oznaczania śladowych zanieczyszczeń w różnych komponentach środowiska



Rys. 8 Chromatogram uzyskany z analizy GC roztworu kalibracyjnego wzorców WWA i wzorca wewnętrznego



Rys. 9 Chromatogram otrzymany z analizy GC ekstraktu z próbki wody



Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku

Procedury wyodrębniania, wzbogacania, wykrywania i oznaczania śladowych zanieczyszczeń w różnych komponentach środowiska

Tabela 2 Zestawienie danych uzyskanych z analiz GC

Analit	Pole powierzchni (wzorce)	Pole powierzchni (próbka)
1	100457	-
2	101328	-
3	100114	-
4	100289	-
5	70128	4008
6	60163	1003
7	90898	11276
8	90967	8493
9	80967	6932
10	100005	7004
11	80345	7125
12	100034	5997
13	60178	7065
14	70968	6128
15	90785	
16	80126	6773
Wzorzec wewnętrzny	200178	20746

b) Co to jest wzorzec wewnętrzny?

c) Na podstawie wyników otrzymanych z analizy GC roztworu kalibracyjnego wzorców WWA i wzorca wewnętrznego (stężenie $12 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) wyznacz współczynnik odpowiedzi dla fenantrenu korzystając z poniższego wzoru:

$$f = \frac{A_a \times m_w}{A_w \times m_a} \quad (1)$$

gdzie,

f – współczynnik odpowiedzi,

A_a – pole powierzchni piku analitu,

m_a – masa analitu,

A_w – pole powierzchni piku wzorca wewnętrznego,

m_w – masa wzorca wewnętrznego.



Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku

Procedury wyodrębniania, wzbogacania, wykrywania i oznaczania śladowych zanieczyszczeń w różnych komponentach środowiska

d) Na podstawie wyznaczonej wartości współczynnika odpowiedzi oraz wyników otrzymanych z analizy GC ekstraktu próbki wody oblicz stężenie fenantrenu w badanej próbce wody korzystając z powyższego wzoru (1).

4.3. Oznaczanie zawartości antracenu w próbce gleby metodą dodatku wzorca przy użyciu HPLC

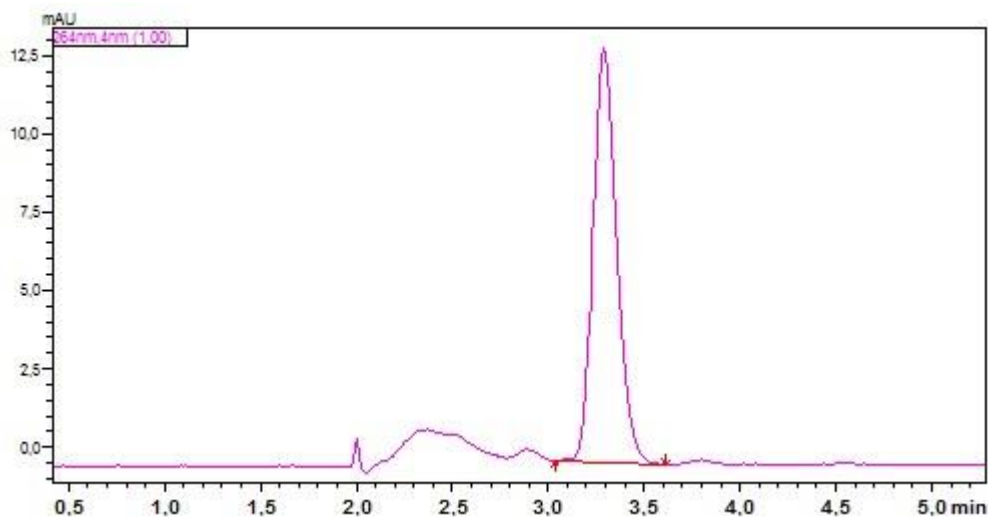
a) Jednym z podejść do oznaczania antracenu w glebie metodą dodatku wzorca jest wyizolowanie analitu z próbki za pomocą ekstrakcji rozpuszczalnikiem i analiza HPLC. Etapy procedury:

- naważenie 1,5 g próbki gleby,
- ekstrakcja gleby rozpuszczalnikiem (20 ml),
- zateżenie (wzbogacenie) za pomocą wyparki próżniowej do objętości 2 ml,
- rozdzielenie ekstraktu na dwie równe części A i B,
- analiza HPLC roztworu wzorcowego antracenu,
- analiza HPLC ekstraktu A,
- dodanie do ekstraktu B odpowiedniej objętości roztworu wzorcowego antracenu o stężeniu 80 $\mu\text{g/ml}$ i analiza HPLC.

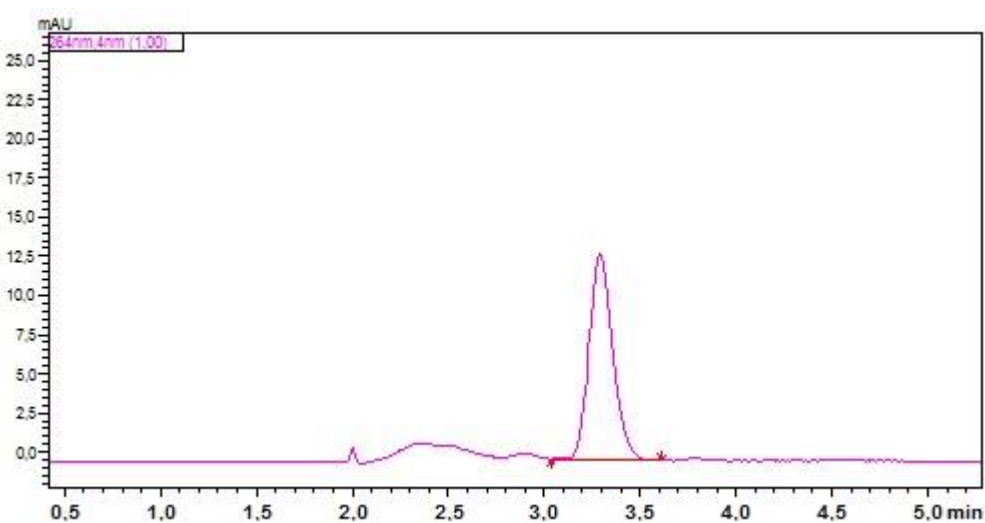


Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku

Procedury wyodrębniania, wzbogacania, wykrywania i oznaczania śladowych zanieczyszczeń w różnych komponentach środowiska



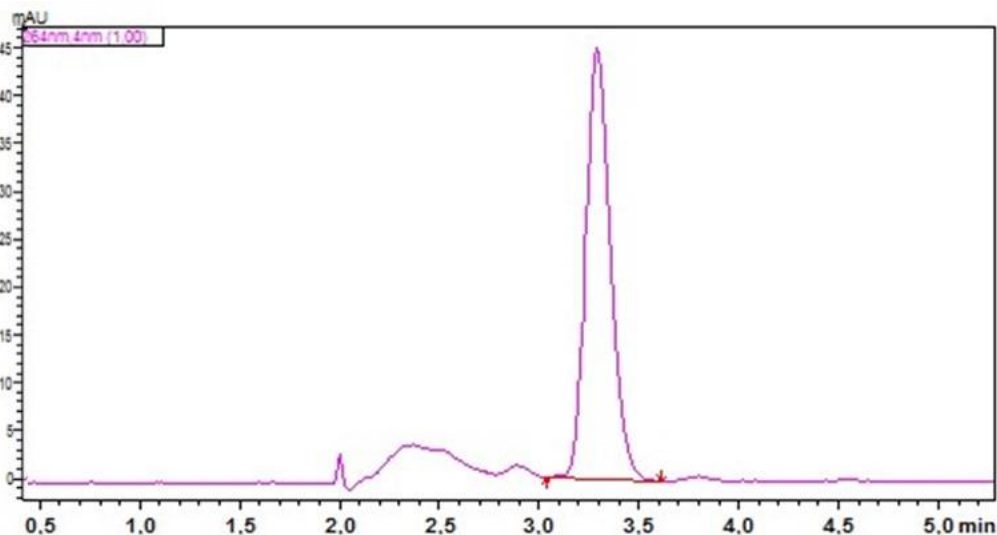
Rys. 10 Chromatogram HPLC roztworu wzorcowego antracenu



Rys. 11 Chromatogram otrzymany z analizy HPLC ekstraktu A z gleby bez dodatku wzorca

Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku

Procedury wyodrębniania, wzbogacania, wykrywania i oznaczania śladowych zanieczyszczeń w różnych komponentach środowiska



Rys. 12 Chromatogram otrzymany z analizy HPLC ekstraktu B z gleby z dodatkiem wzorca

Tabela 3 Zestawienie danych uzyskanych z analiz HPLC

Próbka	Czas retencji [min]	Pole powierzchni piksu
Wzorzec antracenu	3,3	104627
Ekstrakt A bez dodatku wzorca	3,3	80497
Ekstrakt B z dodatkiem wzorca	3,3	241651

a) Oblicz objętość roztworu wzorca antracenu o stężeniu $80 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ jaką powinno się dodać do 1 ml ekstraktu z próbki wody wiedząc, iż ilość wzorca w próbce powinna być ~ 2 razy większa niż analitu. Zakłada się, że stężenie antracenu w wodzie wynosi $\sim 0,4$ ppm.



Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku

Procedury wyodrębniania, wzbogacania, wykrywania i oznaczania śladowych zanieczyszczeń w różnych komponentach środowiska

b) Oblicz stężenie antracenu w badanej próbce gleby stosując poniższy wzór.

$$m = \frac{A_A \times m_w}{A_B - A_A} \quad (2)$$

gdzie,

A_A – pole powierzchni analitu w próbce bez dodatku wzorca,

A_B – pole powierzchni analitu w próbce z dodatkiem wzorca,

m_w – masa dodanego wzorca do próbki,

m – masa analitu w próbce.

Sporządzenie sprawozdania

Student podczas pierwszych zajęć na wydrukowanej instrukcji do ćwiczenia 1 robi notatki, obliczenia, zapisuje przedyskutowane i omówione wspólnie z grupą wnioski i odpowiedzi do zadań. Na końcu zajęć niniejsza, wypełniona instrukcja stanowi sprawozdanie z ćwiczenia 1, które należy oddać prowadzącemu do oceny.

Zakres wymaganych wiadomości:

- podstawy spektrofotometrii UV-Vis oraz chromatografii cieczowej i gazowej,
- ogólne informacje na temat zanieczyszczeń środowiska,
- metody przygotowania próbek środowiskowych do analizy instrumentalnej,
- metody analizy jakościowej i ilościowej, w tym: krzywa kalibracyjna, metoda wzorca wewnętrznego, metoda dodatku wzorca,
- obliczanie stężeń, w tym wyrażonych w ppm.

LITERATURA

1. Stepnowski P., Synak E., Szafrank B., Kaczyński Z. *Monitoring i analityka zanieczyszczeń w środowisku*. Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2010.
2. Stepnowski P., Synak E., Szafrank B., Kaczyński Z. *Techniki separacyjne*. Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2010.
3. Szczepaniak W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, W-wa, 1996.
4. Jeremi Naumczyk, *Chemia środowiska*, PWN, W-wa, 2017.
5. Witkiewicz Z., *Podstawy chromatografii*, WNT, W-wa, 1995, 2005.