Uniwersytet Gdański

Katedra Analizy Środowiska

Analiza śladowych zanieczyszczeń w środowisku

CHEMIA UG

Katedra Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

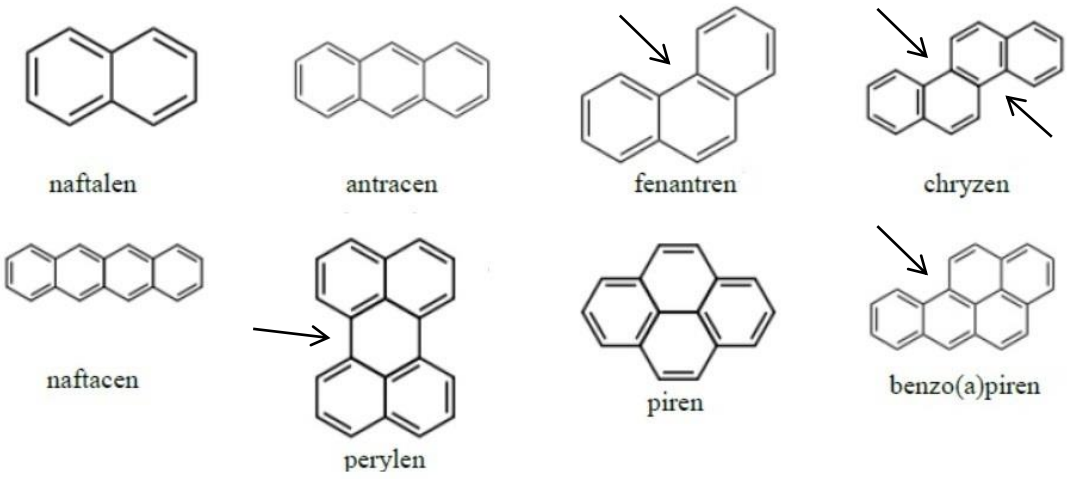
Ćwiczenie 2

Zastosowanie ekstrakcji do fazy stałej (SPE) w celu wyizolowania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z wody i oznaczania ich techniką chromatografii gazowej (GC/FID)

Gdańsk, 2023

1. Wprowadzenie

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) zaliczane są do trwałych zanieczyszczeń organicznych, które charakteryzują się tendencją do bioakumulacji i długim okresem półtrwania w środowisku. WWA składają się z dwóch lub więcej pierścieni aromatycznych i charakteryzują się różnym wzajemnym położeniem tych pierścieni. W niektórych molekułach WWA występuje tzw. „*bay region*" (**Rys. 1**). Jest to obszar o zwiększonej gęstości elektronowej umożliwiający tworzenie się np. adduktów z DNA. Tworzenie adduktów sprawia, iż związki te mogą oddziaływać na replikację komórek organizmu poddanego działaniu WWA. W konsekwencji powoduje to długofalowe działanie kancerogenne.

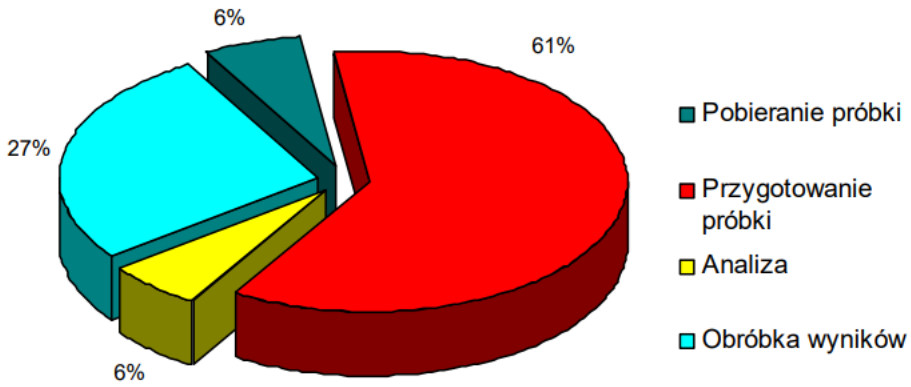


Rys. 1 Struktury przykładowych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych najczęściej oznaczanych w środowisku wodnym. Strzałką został wskazany tzw. „bay region".

Spośród WWA emitowanych do różnych komponentów środowiska około 89,9% ulega akumulacji w glebie, 9,3% gromadzi się w osadach dennych, 0,5% występuje w powietrzu, a 0,3% w wodach powierzchniowych. Skażenie wód powierzchniowych przez WWA może pochodzić ze ścieków przemysłowych (koksowniczych, hutniczych, gazowniczych i rafineryjnych), z wymywania z gleby i nawierzchni dróg (ścieranie gumy opon i asfaltu) przez deszcz, a także z atmosfery (proces niepełnego spalania) przez sedymentację i opad wraz z deszczem i śniegiem. Niepokojące zjawisko stanowi fakt, iż rozpuszczalność WWA w wodzie znacznie zwiększają detergenty. WWA w wodach powierzchniowych są niebezpieczne nie tylko dla człowieka. Stanowią zagrożenie dla całego ekosystemu, oddziałują pośrednio na różne jego piętra, między

innymi na drodze transformacji metabolicznej. Akumulacja WWA w glonach i niższych zwierzętach morskich ma wpływ na wyższe poziomy troficzne, przykładowo bardzo wysokie stężenia pirenu i benzo[k]fluorantenu obserwuje się w mięsie i skórze ryb (od 42 do 405 mg/kg). Mimo iż, WWA występują w wodach w niewielkim stężeniu, ze względu na toksyczne a nawet rakotwórcze działanie niektórych z tych związków, wymagane jest ich oznaczanie, zwłaszcza w wodzie pitnej.

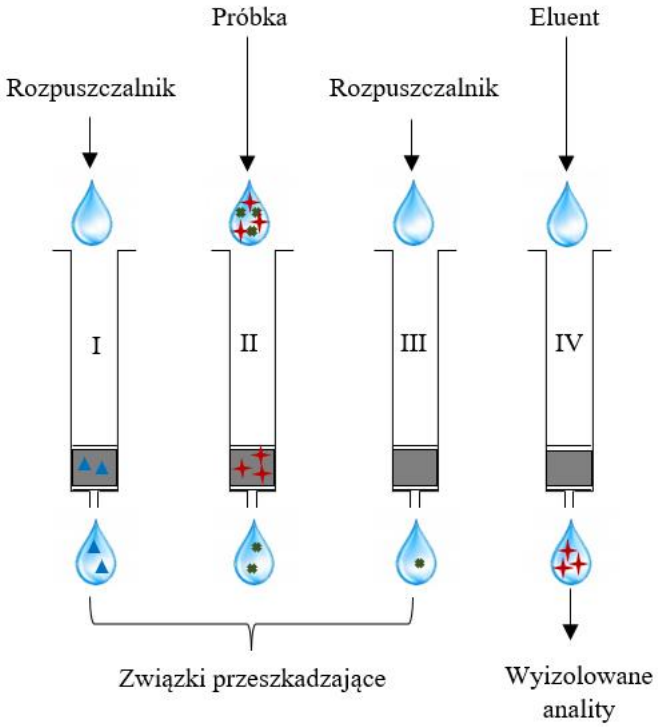
Występowanie WWA w śladowych ilościach (stężenia na poziomie ng/l lub µg/l) w wodzie wymaga stosowania selektywnych i niezawodnych metod izolacji i wzbogacania oraz technik wykrywania i oznaczania charakteryzujących się dużą czułością. Przygotowanie próbek do analizy jest procesem złożonym. Wszelkie błędy pojawiające się na tym etapie rzutują na wynik końcowego oznaczenia. Dodatkowym utrudnieniem jest fakt, że pobieranie i przygotowanie próbki zajmuje blisko 2/3 czasu trwania całej procedury (**Rys. 2**).



Rys. 2 Czasochłonność poszczególnych etapów procedury analitycznej

Jedną z klasycznych metod izolowania i wzbogacania zanieczyszczeń śladowych z wody jest ekstrakcja do fazy stałej (SPE, ang. *Solid-Phase Extraction*). SPE polega na przeniesieniu analitów znajdujących się w próbce ciekłej do fazy stałej (sorbentu) upakowanej w kolumience (**Rys. 3**). Rozdzielenie związków zachodzi w oparciu o współczynnik podziału analitów miedzy wodę i stały sorbent. Uwolnienie analitów z sorbentu zachodzi przy pomocy rozpuszczalnika (oznaczenie końcowe HPLC) lub na drodze termicznej (oznaczenie końcowe GC).

Rys. 3 Przykładowe komercyjnie dostępne kolumienki ze stałym sorbentem wykorzystywane w ekstrakcji do fazy stałej



Rys. 4 Etapy ekstrakcji do fazy stałej

SPE składa się z kilku etapów (**Rys. 4**):

I (a) - etap przemywania kolumienki wraz z wypełnieniem rozpuszczalnikami mającymi siłę eluotropową większą niż stosowane eluenty w etapie IV. Usuwa się w ten sposób substancje poprodukcyjne (alkeny C_{16}-C_{24}, alkiloftalany, alkany, silanole, siloksany), które mogą się wyekstrahować z komercyjnie dostępnych kolumienek.

I (b) – etap kondycjonowania (solwatacji) wypełnienia kolumienki. Wykonuje się głównie w przypadku zastosowania kolumienek wypełnionych złożem na bazie krzemionki. Przykładowo, żel krzemionkowy modyfikowany fazą oktadecylową (C_{18}) ma własności lipofilne, dlatego złoże najpierw przemywa się metanolem lub 2-propanolem a następnie mieszaniną wody i metanolu lub 2-propanolu. W trakcie kondycjonowania łańcuchy węglowodorowe ulegają wyprostowaniu oddalając się od powierzchni sorbentu, tworząc tzw. “szczotkę” o znacznie powiększonej powierzchni aktywnej. Ważne jest użycie do kondycjonowania rozpuszczalnika o właściwościach najbardziej zbliżonych do właściwości matrycy badanej próbki (wody dejonizowanej dla próbek wodnych) oraz utrzymywanie sorbentu w pełni pokrytego rozpuszczalnikiem do momentu naniesienia próbki.

II - etap naniesienia próbki wody na kolumienkę. Jeśli próbka zawiera zawiesiny, przed naniesieniem należy ją odwirować lub przesączyć – aby uniknąć zatkania filtru wlotowego kolumienki.

III - kolejny etap obejmuje usunięcie z przestrzeni między cząstkami sorbentu oraz z wnętrza jego porów substancji niezwiązanych (substancji przeszkadzających) przez przemycie rozpuszczalnikiem, w którym znajdował się analit. Można zastosować inne rozpuszczalniki, o sile eluotropowej większej, jeśli nie spowodują wymycia analitu. W ten sposób usuwa się ewentualne interferenty pochodzące z matrycy, co zwiększa czystość frakcji analizowanej. Resztki rozpuszczalnika przemywającego usuwa się przez suszenie strumieniem powietrza (zasysanym przez pompkę wodną). Czas suszenia zależy od lotności rozpuszczalnika i masy sorbentu.

IV – wymywanie (elucja) analitów zatrzymanych na złożeniu kolumienki. Elucja wymaga rozpoznania pochodzenia próbki, potencjalnych substancji przeszkadzających (interferentów) i właściwości fizyko-chemicznych oznaczanych substancji. Dobór rozpuszczalnika do elucji

zależy od miejsca rozpuszczalnika w szeregu eluotropowym w stosunku do analitu, rodzaju fazy stałej oraz potrzeb związanych z kolejnymi etapami procedury oznaczania (np. lotność, możliwość zastosowania detektora spektrofotometrycznego UV/Vis). W przypadku ekstrakcji WWA z wody z zastosowaniem niepolarnych faz oktadecylowych (C_{18}) najczęściej stosuje się elucję takimi rozpuszczalnikami, jak: dichlorometan, pentan, heksan, aceton, octan etylu, acetonitryl lub ich mieszaninami. Można też zastosować elucję sekwencyjną, tzn. wymywanie analitów kolejno różnymi rozpuszczalnikami, różniącymi się siłą elucyjną.

2. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest wyizolowanie frakcji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z próbki wody metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) a następnie oznaczenie ich zawartości w wodzie metodą wzorca wewnętrznego i techniką chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC/FID).

3. Wykonanie ćwiczenia

3.1. Przygotowanie próbki do ekstrakcji

250 cm^3 badanej wody umieścić w kolbie stożkowej o pojemności 500 cm^3, dodać 2,5 cm^3 roztworu wzorca wewnętrznego 2-metyloantracenu o stężeniu 128 $\mu g/cm^3$ i zawartość kolby wymieszać.

3.2. Przemywanie i kondycjonowanie kolumienki SPE C_{18}

Kolumienkę C_{18} (żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi) podłączyć do odbieralnika (**Rys. 5**), przemyć 3 cm^3 heksanu, kolejno 3 cm^3 metanolu następnie 2 razy po 3 cm^3 mieszaniny woda:metanol (9:1, v:v). Kolumienkę należy kondycjonować powoli, nie dopuszczając do wysuszenia złoża.

Rys. 5 Zestaw do ekstrakcji do fazy stałej

3.3. Wprowadzenie próbki na kolumienkę i ekstrakcja

Na przygotowaną kolumienkę wprowadzić 3 cm^3 próbki, podłączyć zbiornik i powoli, unikając zapowietrzania wlać do zbiornika resztę próbki wody.

3.4. Przemycie kolumienki i suszenie

Przepuścić powoli przez kolumienkę 3 cm^3 mieszaniny MeOH:H_2O (1:1, v:v) a następnie suszyć pod próżnią 10 min.

3.5. Wymywanie frakcji WWA

Odłączyć kolumienkę od zestawu, umieścić jej wylot w naczynku, do którego będzie zbierany eluat (fiolka o objętości 1,5 cm^3). Wprowadzić na kolumienkę 2 razy po 500 µl dichlorometanu.

3.6. Regeneracja złoża

Po zebraniu eluatu kolumienkę ponownie umieścić w zestawie (**Rys. 5**) i przemyć 4 razy po 500 µl dichlorometanu a następnie 2 razy po 3 cm^3 metanolu, stosując niewielkie podciśnienie i wysuszyć.

3.7. Analiza właściwa WWA techniką chromatografii gazowej

3.7.1. Analiza chromatograficzna roztworów wzorcowych WWA o stężeniu 100 µg/ml:

a) naftalenu,

b) fenantrenu,

c) fluorantenu.

3.7.2. Analiza chromatograficzna roztworu wzorca wewnętrznego (2-metyloantracenu) o stężeniu 128 µg/ml

3.7.3. Analiza chromatograficzna wydzielonej frakcji WWA

Warunki pracy chromatografu gazowego:

- chromatograf gazowy z detektorem FID
- kolumna kapilarna RTX-5; 30 m; 0,25 mm średnica wewnętrzna; 0,25 µm grubość filmu fazy ciekłej;
- początkowa temp. kolumny 70ºC, narost 10ºC/min do 300ºC;
- temperatura dozownika 320ºC;
- temperatura detektora 320ºC, czułość (range) 1×10^{-1};
- gaz nośny Ar, stały przepływ 1 ml/min, spliter 1:50

4. Wykonanie sprawozdania

Należy obliczyć współczynniki odpowiedzi dla naftalenu, fenantrenu oraz fluorantenu. Następnie na podstawie wyznaczonych wartości współczynników odpowiedzi oraz wyników otrzymanych z analizy GC ekstraktu próbki wody obliczyć zawartości poszczególnych WWA

w badanej próbce wody (w μg/dm^3) i porównać je ze standardami jakości wody pitnej. Sprawozdanie powinno składać się z następujących części:

- cel ćwiczenia,
- schemat doświadczenia,
- otrzymane wyniki,
- obliczenia,
- wnioski.

5. Zakres wymaganych wiadomości

- Ogólne informacje o WWA,
- ekstrakcja do fazy stałej,
- chromatografia gazowa, zasada działania, budowa aparatu, podstawowe pojęcia i definicje,
- zasada działania detektora płomieniowo-jonizacyjnego (FID),
- metoda wzorca wewnętrznego.

Literatura

1. M. Vijayanand et al., Polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in the water environment: A review on toxicity, microbial biodegradation, systematic biological advancements, and environmental fate, *Environmental Research*, 2023, Vol. 227, 115716, DOI:10.1016/j.envres.2023.115716

2. F.J Santos et al., The application of gas chromatography to environmental analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 2002, Vol. 21 (9–10), s. 672-685, DOI:10.1016/S0165-9936(02)00813-0

3. Stepnowski P., Synak E., Szafranek B., Kaczyński Z. Monitoring i analityka zanieczyszczeń w środowisku. Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2010.

4. Stepnowski P., Synak E., Szafranek B., Kaczyński Z. Techniki separacyjne. Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2010.