



Uniwersytet
Gdański



Monitoring Środowiska



Katedra Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie 2

Zastosowanie spektrometrii w nadfiolecie i świetle widzialnym (UV-Vis) do oznaczania fenoli w wodzie



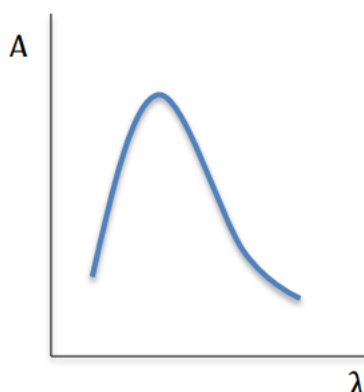
Monitoring Środowiska

Zastosowanie spektrometrii w nadfiolecie i świetle widzialnym (UV-Vis) do oznaczania fenoli w wodzie

1. Wprowadzenie

1.1. Spektrofotometria

Spektrofotometria polega na pomiarze spektrofotometrem stosunku natężeń (lub funkcji tego stosunku, np. absorbancji) dwóch wiązek promieniowania w funkcji długości fali. Jedną wiązką jest wiązka promieniowania oddziałującego z badaną próbką, a drugą wiązką odniesienia. Zbadanie zależności absorbancja-długość fali (UV-VIS) pozwala na uzyskanie tzw. widma absorpcyjnego badanego związku (**Rys. 1**).



Rys. 1 Przykładowe widmo absorpcyjne

Wystąpienie maksimum absorpcji na widmie elektronowym związane jest na ogół z obecnością w cząsteczce badanego związku łatwo wzbudzalnych elektronów. Mogą to być np. elektrony częściowo zajętych podpowłok d jonów metali przejściowych. Ten rodzaj absorpcji powoduje zabarwienie wodnych roztworów takich metali jak: chrom, mangan, żelazo, kobalt, nikiel i in. Pochłanianie światła w tym zakresie jest typowe dla związków organicznych ze względu na występowanie w ich strukturze wiązań wielokrotnych. Związki organiczne nasycone nie absorbują światła nawet w dalekim nadfiolecie. Nienasycone grupy, które absorbują promieniowanie w zakresie 200-800 nm są nazywane chromoforami (**Tabela 1**).

Metodą spektrofotometrii UV-VIS można oznaczać substancje organiczne (np. w tym węglowodory aromatyczne, aldehydy, ketony, kwasy i aminy) i nieorganiczne (np. pierwiastki ziem rzadkich, ozon, SO₂) wykazujące absorpcję w nadfiolecie, związki absorbujące



Monitoring Środowiska

Zastosowanie spektrometrii w nadfiolecie i świetle widzialnym (UV-Vis) do oznaczania fenoli w wodzie

promieniowanie w zakresie widzialnym, w tym barwne związki organiczne (barwniki) i barwne sole metali (np. KMnO_4 , CuSO_4) oraz substancje, których formy absorbujące promieniowanie uzyskuje się na drodze reakcji chemicznych. Do celów tych najczęściej wykorzystuje się reakcje kompleksowania. Opracowano wiele procedur oznaczeń kationów metali w formie barwnych związków kompleksowych z ligandami organicznymi.

Tabela 1 Właściwości wybranych chromoforów

Chromofor	Związek	Rozpuszczalnik	Maksimum absorpcji [nm]
-NO ₂	Nitrometan	Etanol	167
C=C	Okten	Heksan	185
C=S	Tiowęglan dietylu	Etanol	330

W metodach spektrofotometrycznych pierwszym etapem pomiarów jest pomiar absorpcji rozpuszczalnika w którym rozpuszczony jest badany analit (w metodach bezpośrednich) lub ślepej próby (w metodach pośrednich). Po tym pomiarze nowoczesne spektrofotometry automatyczne ulegają „wyzerowaniu”. Oznacza to, iż kolejne pomiary będą wskazywały absorpcję jedynie oznaczanego analitu (nie uwzględniając absorpcji tła czyli wszystkich nieoznaczanych składników próbki). Tak więc ślepa próba to próba chemiczna wykonana w identycznych warunkach i z tymi samymi odczynnikami co analiza badanego materiału, lecz bez dodawania oznaczanego składnika, czyli analitu.

Metody spektrofotometryczne bezpośrednie są to metody, których podstawą jest selektywna absorpcja oznaczanego składnika, który wykazuje zdolność pochłaniania promieniowania w zakresie UV-Vis. W metodach pośrednich mierzy się absorpcję barwnych produktów reakcji analitu z określonymi odczynnikami. Stosuje się je do oznaczania analitów, które nie wykazują zdolności absorpcji promieniowania w zakresie UV-Vis.

1.2. Analiza ilościowa

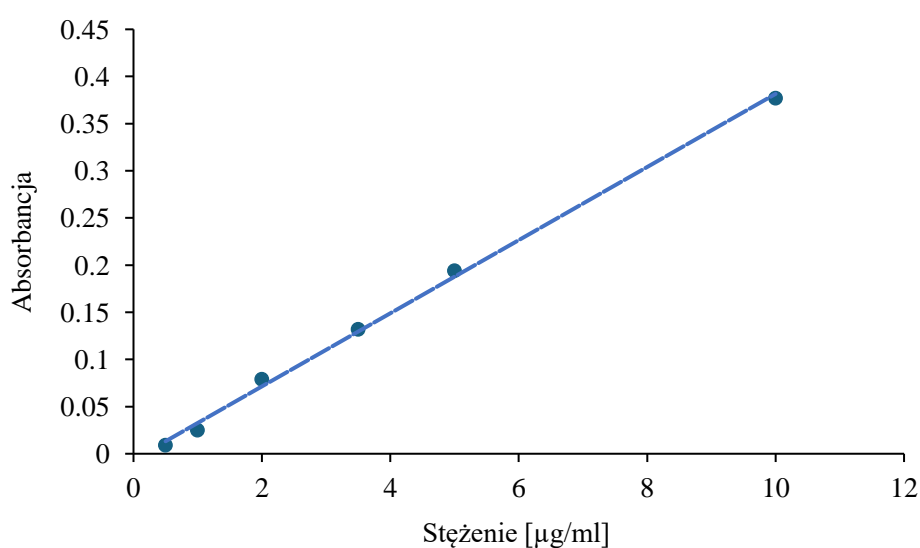
Najczęściej do wykonywania ilościowych oznaczeń spektrofotometrycznych jest stosowana metoda krzywej wzorcowej (krzywej kalibracyjnej). Krzywą wzorcową nazywamy przedstawioną graficznie zależność absorpcji od stężenia substancji wzorcowej. Wykonanie takiego wykresu



Monitoring Środowiska

Zastosowanie spektrometrii w nadfiolecie i świetle widzialnym (UV-Vis) do oznaczania fenoli w wodzie

umożliwia bezpośrednie odczytywanie szukanych stężeń na podstawie zmierzonych wartości absorbancji oznaczanych próbek. Prostoliniowy przebieg tej zależności w badanym zakresie świadczy o spełnieniu przez układ prawa Lamberta-Beera. W celu wykreślenia krzywej wzorcowej przygotowuje się 5 – 6 roztworów wzorcowych o coraz większych stężeniach tak dobranych, aby różniły się o około 30% i obejmowały swym zakresem stężenia oznaczanych roztworów.



Rys. 2 Przykładowa krzywa kalibracyjna

1.3. Fenole jako zanieczyszczenie środowiska

Fenole należą do związków aromatycznych, spośród których wyróżniają się obecnością co najmniej jednej grupy hydroksylowej – OH związanej bezpośrednio z węglem pierścienia aromatycznego. W ściekach najczęściej występują fenole mono- i diwodorotlenowe. Szczególnie szkodliwe są fenole monowodorotlenowe, określane jako „lotne z parą wodną”. W ściekach miejskich obecność fenoli jest na ogół niewielka, natomiast duże ilości występują w różnych ściekach przemysłowych, szczególnie z koksowni, gazowni, fabryk mas plastycznych, włókien syntetycznych, farmaceutycznych itp. Fenole, dostając się ze ściekami do wód powierzchniowych, mogą powodować duże trudności przy wykorzystywaniu tych wód dla potrzeb komunalnych. Często na skutek niedokładnego oczyszczenia wody powierzchniowej fenol spotyka się w wodzie pitnej. Według aktualnego rozporządzenia maksymalna wartość to 0,1 mg/l.



Monitoring Środowiska

Zastosowanie spektrometrii w nadfiolecie i świetle widzialnym (UV-Vis) do oznaczania fenoli w wodzie

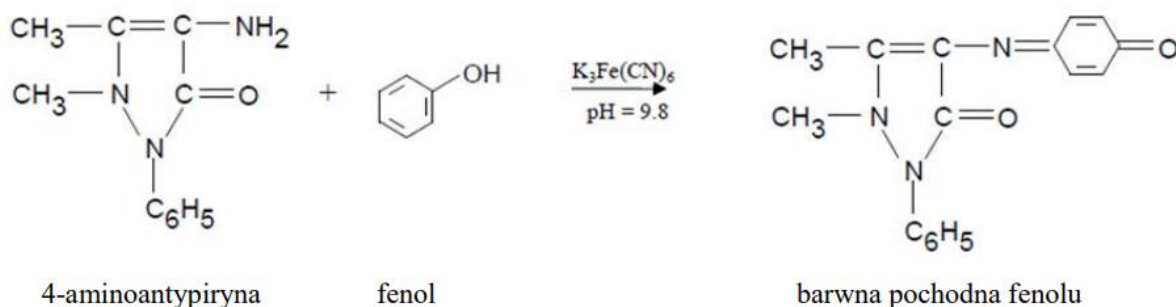
Fenol należy do silnych trucizn. Działa porażająco na układ nerwowy i krążeniowy. Uszkadza drogi oddechowe, powoduje denaturację (ścinanie) białek, działa bardzo silnie na skórę, wywołując nekrozę polegającą na początkowym bieleniu, a po kilku dniach jej łuszczeniu. Może powodować methemoglobinemię - sinicę, tzn. zaburzenia i zahamowanie procesu przenoszenia tlenu przez hemoglobinę.

Na skutek chlorowania wód powierzchniowych zawierających fenole powstają chlorofenole. Woda pitna zawierająca chlorofenole ma bardzo intensywny, odrażający zapach i smak charakterystyczny dla tych związków. Chlorofenole stanowią grupę silnych trucizn działających na układ nerwowy, krążeniowy i oddechowy. Mogą wywoływać białaczki i guzy chłoniakowe oraz zmiany alergiczne skóry i błon śluzowych.

1.4. Zasada oznaczania fenoli metodą pośrednią

Za pomocą spektrofotometrii UV/VIS można oznaczyć fenole obecne w wodzie lub ściekach metodą pośrednią, tzn. po przeprowadzeniu ich w barwny związek absorbujący promieniowanie UV/VIS. Do oznaczeń wykorzystuje się tworzenie przez fenole barwnych pochodnych z 4-aminoantypiryną (1-fenyl-2,3-dimetylo-4-aminopirazolonem).

Reakcję przeprowadza się w środowisku alkalicznym (pH 9,8) w obecności heksacyjanożelazianu (III) potasu jako utleniacza:



Produkty reakcji charakteryzują się barwą od zielonożółtej do pomarańczowej, w zależności od stężenia fenoli i absorbują promieniowanie w zakresie widzialnym. Pomiaru absorbancji dokonuje się przy długości fali $\lambda = 460$ nm.



Monitoring Środowiska

Zastosowanie spektrometrii w nadfiolecie i świetle widzialnym (UV-Vis) do oznaczania fenoli w wodzie

Z uwagi na podatność fenoli na biochemiczne i chemiczne utlenianie analizę należy wykonać w krótkim czasie (do 4 godz. od momentu pobrania próbki) lub utrwalić próbkę bezpośrednio po pobraniu. Utrwalenie wykonuje się przez zakwaszenie kwasem fosforowym (V) wobec oranżu metylowego do $\text{pH} = 4.0$. Bezpośrednio po tym dodaje się roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) – jako inhibitora biodegradacji - w takiej ilości, aby uzyskać stężenie 1 g/l wody. Jony Cu^{2+} tworzą nielotne kompleksy z fenolami wielowodorotlenowymi, wytrącają ewentualne zanieczyszczenia jonami S_2^- w postaci CuS . Środowisko kwaśne zapobiega tworzeniu się $\text{Cu}(\text{OH})_2$, który utlenia fenole. Jeżeli próbka wody jest zanieczyszczona olejami lub smarami, należy je usunąć poprzez ekstrakcję tetrachlorkiem węgla.

2. Cel ćwiczenia

Spektrofotometryczne oznaczanie fenoli w wodzie powierzchniowej metodą pośrednią.

3. Wykonanie ćwiczenia

1. Z roztworu podstawowego fenolu o stężeniu 0,1 mg/ml przygotować roztwór roboczy o stężeniu 0,001 mg/ml w 200 ml wody. Obliczenia sprawdzić u prowadzącego.
2. Do pięciu rozdzielaczy o pojemności 500 ml odmierzyć odpowiednie objętości roztworu roboczego fenolu (obliczenia sprawdzić z prowadzącym) tak aby w rozdzielaczach znalazły się następujące masy fenolu: 0 mg, 0,01 mg, 0,02 mg, 0,04 mg oraz 0,06 mg.
3. Zawartość rozdzielaczy uzupełnić wodą destylowaną do objętości 100 ml.
4. Do szóstego rozdzielacza wprowadzić 100 ml wody skażonej fenolem.
5. Następnie do rozdzielaczy dodać 5 ml buforu amonowego. Roztwór powinien mieć charakter zasadowy $\text{pH} \sim 10$, jeśli roztwór jest za mało alkaliczny dodawać kroplami wodę amoniakalną do uzyskania wymaganego pH .
6. Do rozdzielaczy wprowadzić kolejno 3 ml 2% roztworu 4-aminoantypiryny i 3 ml 8% roztworu heksacyjanożelazianu(III) potasu. Zawartość rozdzielaczy wymieszać po dodaniu każdego z tych odczynników.
7. Po upływie 15 min wprowadzić 10 ml chloroformu i intensywnie wytrząsnąć 3-5 min.



Monitoring Środowiska

Zastosowanie spektrometrii w nadfiolecie i świetle widzialnym (UV-Vis) do oznaczania fenoli w wodzie

8. Po rozdzieleniu się warstw: wodnej i chloroformowej, warstwę chloroformową przesączyć przez sączonek zawierający bezwodny Na_2SO_4 do cylindrów miarowych (25 ml).
9. Warstwy wodne ekstrahować ponownie (2 razy po 5 ml chloroformu).
10. Kolejne frakcje chloroformowe przesączyć przez sączonek zawierający bezwodny Na_2SO_4 do tych samych cylindrów miarowych.
11. Objętość cylindrów uzupełnić do 20 ml chloroformem i wymieszać.
12. W celu wykreślenia krzywej kalibracyjnej $A = f(c)$ zmierzyć absorbancję poszczególnych roztworów chloroformowych przy długości fali $\lambda = 460 \text{ nm}$. Wyniki zapisać w tabeli wg poniższego schematu. Wykreślić w Excelu krzywą kalibracyjną oraz wyznaczyć równanie krzywej i współczynnik determinacji R^2 .

Lp.	Masa fenolu [mg]	Absorbancja
1	0,01	
2	0,02	
3	0,04	
4	0,06	
5	Próbka badana	

Na podstawie otrzymanego równania krzywej kalibracyjnej wyznaczyć masę fenolu w badanym ekstrakcie a następnie obliczyć stężenie fenolu w badanej wodzie.

4. Wykonanie sprawozdania

Sprawozdanie powinno składać się z następujących części:

- cel ćwiczenia,
- schemat doświadczenia,
- otrzymane wyniki,
- obliczenia,
- wnioski,
- spis wykorzystanej literatury.



Monitoring Środowiska

Zastosowanie spektrometrii w nadfiolecie i świetle widzialnym (UV-Vis) do oznaczania fenoli w wodzie

Omówić uzyskane wyniki, w tym: dokładność uzyskanej krzywej kalibracyjnej, parametr R^2 . Porównać stężenie fenolu w badanej wodzie z normami prawnymi.

5. Zakres wymaganych wiadomości

- organiczne zanieczyszczenia wody i ich pochodzenie ze szczególnym uwzględnieniem zanieczyszczenia fenolami, indeks fenolowy¹,
- zasada oznaczania fenoli metodą pośrednią,
- zadania rachunkowe z opracowania „Monitoring środowiska – obliczenia”,
- dopuszczalne zawartości fenolu w wodzie pitnej^{1,2},
- krzywa kalibracyjna,
- SPEKTROFOTOMETRIA: podstawy spektrofotometrycznego oznaczania substancji (absorpcja promieniowania elektromagnetycznego, absorbancja, transmitancja, prawo Lamberta-Beera, budowa fotometru, metody pośrednia i bezpośrednia spektrofotometrycznego oznaczania substancji).

Literatura

¹Skorzystać należy z opracowania „Monitoring jakości wody” oraz ze skryptu „Monitoring i Analityka zanieczyszczeń w środowisku” i „Techniki separacyjne – rozdział 1.8.1. Metoda krzywej kalibracyjnej”.

Informacje dotyczące technik spektrofotometrycznych znajdują się w książkach:

1. Szczepaniak W., Metody instrumentalne w analizie chemicznej. W-wa, PWN, 1996.
2. Minczewski J., Marczenko Z., Chemia analityczna. W-wa, PWN, 1976. tom 3.
3. Ewing G. W., Metody instrumentalne w analizie chemicznej. W-wa, PWN, 1980

Źródła zewnętrzne

²Link do wyników pomiarów jakości wody pitnej dla Gdańska:

<https://www.gdanskiewodociagi.pl/StrefaKlienta/Jakosc.aspx>

³Podstawy prawne państwowego monitoringu wód:

<https://wody.gios.gov.pl/pjwp/publications/PPPMW>

⁴Raporty GIOŚ o stanie środowiska:

<https://www.gios.gov.pl/pl/stan-srodowiska/raporty-o-stanie-srodowiska>



Monitoring Środowiska

Zastosowanie spektrometrii w nadfiolecie i świetle widzialnym (UV-Vis) do oznaczania fenoli w wodzie

Normy prawne:

1. Rozporządzenie Ministra Infrastruktury z dnia 25 czerwca 2021 r. w sprawie klasyfikacji stanu ekologicznego, potencjału ekologicznego i stanu chemicznego oraz sposobu klasyfikacji stanu jednolitych części wód powierzchniowych, a także środowiskowych norm jakości dla substancji priorytetowych
2. Rozporządzenie Ministra Infrastruktury z dnia 13 lipca 2021 r. w sprawie form i sposobu prowadzenia monitoringu jednolitych części wód powierzchniowych i jednolitych części wód podziemnych
3. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2017 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi.

Niezbędne szkło i odczynniki:

- świeżo przygotowany roztwór podstawowy fenolu w wodzie o stężeniu 0,1 mg/ml (10 ml),
- woda powierzchniowa skażona fenolem,
- bufor amonowy,
- papierowe wskaźniki pH,
- woda amoniakalna do ustalenia pH,
- 2% roztwór 4-aminoantypiryny,
- bezwodny Na_2SO_4 ,
- 8% roztwór heksacyjanożelazianu (III) potasu,
- chloroform,
- kolba miarowa 200 ml,
- szklana pipeta 2 ml,
- szklana pipeta 5 ml,
- 6 x rozdzielacz o pojemności 500 ml,
- szklana pipeta 10 ml,
- szklana pipeta 5 ml,
- cylinder miarowy 10 ml,
- 7 x cylinder miarowy 25 ml,
- cylinder miarowy 50 ml,
- cylinder miarowy 100 ml,
- tryskawka z wodą dejonizowaną,
- 4 x bagietka szklana,
- 6 x lejek,
- filtry dopasowane do lejków,
- pipety Pasteura,
- metalowa łyżeczka.