



Uniwersytet
Gdański



Monitoring Środowiska



Katedra Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie 4

Wyodrębnianie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA)
z gleby

Gdańsk, 2024



Monitoring Środowiska

Wyodrębnianie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z gleby

1. Wprowadzenie

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) zaliczane są do grupy zanieczyszczeń organicznych, a ich obecność zaobserwować można niemal w każdym elemencie środowiska. Stanowią one obszerny zbiór substancji chemicznych obejmujący ponad 200 związków zbudowanych z co najmniej 2 pierścieni aromatycznych niezawierających żadnych podstawników. W naturalnych warunkach występują zawsze w postaci mieszaniny o składzie zależnym od specyfiki i właściwości badanego materiału.

WWA powstają w wyniku pirolizy lub procesu niepełnego spalania materii organicznej, w tym większości węglowodorów z wyjątkiem pochodnych metanu. Dlatego też największe ilości tych związków uwalniane są jako produkt uboczny podczas pozyskiwania energii przy użyciu paliw kopalnych, mechanicznej eksploatacji tworzyw sztucznych lub na skutek migracji wraz z ciekłymi formami odpadów czy pyłem. Do najistotniejszych obiektów charakteryzujących się wysokim stopniem zagrożenia emisji WWA zaliczyć można: koksownie, rafinerie, huty oraz ciepłownie i elektrociepłownie zasilane paliwami kopalnymi. Należy również wspomnieć, iż ogromne ilości tych substancji generowane są w obrębie sektora transportu, głównie w postaci spalin, wycieków oraz na skutek ścierania opon.

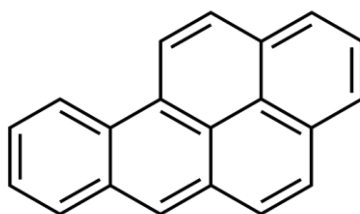
Duże zainteresowanie problematyką związaną z występowaniem i migracją WWA w obrębie środowiska naturalnego spowodowane jest przede wszystkim potwierdzonymi w wielu badaniach mutagennymi, kancerogennymi oraz teratogennymi właściwościami niektórych przedstawicieli tych substancji. Związki takie jak benzo(a)piren posiadają zdolność do penetracji błon komórkowych żywych organizmów, gdzie pod wpływem licznych enzymów ulegają metabolizmowi, tworząc związki epoksydowe zdolne do wytwarzania kowalencyjnych wiązań z fragmentami DNA. Zjawisko to jest przyczyną powstawania spontanicznych mutacji genetycznych prowadzących niejednokrotnie do kancerogenezy. W **Tabeli 1** przedstawiony został wykaz związków charakteryzujących się najwyższą aktywnością kancerogenną wraz ze względными współczynnikami kancerogenności (k). Współczynnik k obliczony został w odniesieniu do benzo(a)piranu (**Rys. 1**), ponieważ związek ten uważany jest powszechnie za jeden z najważniejszych i najczęściej spotykanych kancerogenów.

Monitoring Środowiska

Wyodrębnianie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z gleby

Tabela 1 Wartości względnych współczynników kancerogenności (k)

Lp.	Związek	Względny współczynnik
1	Dibenzo(a,h)antracen	5
2	Benzo(a)piren	1
3	Benzo(a)antracen	0,1
4	Benzo(b)fluoranten	0,1
5	Benzo(k)fluoranten	0,1
6	Indeno(1,2,3-c,d)piren	0,1
7	Antracen	0,01
8	Chryzen	0,01



Rys. 1 Struktura benzo(a)pirenu

Z uwagi na najwyższy poziom depozycji powiązany z wysokim stopniem zarówno bezpośredniego jak i pośredniego zagrożenia dla środowiska i zdrowia człowieka, występowanie WWA w środowisku gruntowym uważane jest za jeden z najważniejszych problemów dotyczących tej grupy zanieczyszczeń. Duża koncentracja WWA w glebie związana jest z fizykochemicznymi właściwościami tych substancji. Brak podstawników oraz pierścieniowa budowa sprawiają, iż zanieczyszczenia te charakteryzują się słabą rozpuszczalnością w wodzie oraz wykazują silne powinowactwo do sorpcji na powierzchni cząstek stałych. Niestety zjawisko to jest przyczyną wielu problemów, które ze względu na czas działania podzielić można na natychmiastowe (działanie ostre) oraz przewlekłe. Do natychmiastowych zalicza się bezpośrednie toksyczne oddziaływanie w stosunku do endogennych organizmów znajdujących się w najbliższym otoczeniu, a także niekorzystne zmiany parametrów fizykochemicznych gleby prowadzące do zaburzeń biodostępności substancji odżywczych i utrudnień w dostępności tlenu. Problemami długoterminowymi (przewlekłymi) są z kolei wszelkie aspekty dotyczące generowania zmian genetycznych w skażonych ekosystemach oraz powstawanie silnie skażonych ognisk emisyjnych, które są przyczyną wielofazowej migracji, odbywającej się w układach gleba - wody gruntowe/powierzchniowe – atmosfera.



Monitoring Środowiska

Wyodrębnianie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z gleby

Oznaczanie WWA w próbkach środowiskowych stanowi nie lada wyzwanie dla współczesnej analityki. Ze względu na skomplikowany skład tego typu próbek pełna procedura badawcza obejmuje kilka etapów, do których należą:

- pobieranie próbki,
- przechowywanie,
- wstępne przygotowanie próbki obejmujące wyodrębnienie związków badanych z matrycy, zateżanie czy przekształcanie analitu w postać bardziej trwałą lub dogodną dla końcowego oznaczania,
- analiza właściwa,
- obróbka danych.

1.1. Kolumnowa chromatografia adsorpcyjna

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne wydziela się z gleby najczęściej poprzez ekstrakcję niepolarnym rozpuszczalnikiem organicznym. Proces ten nie jest selektywny. W ekstrakcie, poza węglowodorami, znajdują się inne grupy związków, poza tym węglowodorów alifatycznych jest zdecydowanie więcej niż aromatycznych co, w zdecydowanej większości przypadków, uniemożliwia wykorzystanie ekstraktu do analizy właściwej.

Skuteczną i często stosowaną na skalę preparatywną metodą rozdzielania mieszanin związków organicznych jest cieczowa chromatografia adsorpcyjna. W swej istocie chromatografia obejmuje interakcję między dwiema fazami: fazą ruchomą i fazą stacjonarną. Faza ruchoma odnosi się do płynu lub gazu, który przenosi mieszaninę, podczas gdy faza stacjonarna jest materiałem selektywnie absorbującym (nieruchomym), przez który przepływa faza ruchoma. Gdy faza ruchoma styka się z fazą stacjonarną, różne składniki mieszaniny oddziałują w różny sposób, co prowadzi do ich rozdzielania na podstawie ich różnych właściwości fizycznych i chemicznych. Chromatografia cieczowa wykorzystuje ciekłą fazę ruchomą, zwykle rozpuszczalnik lub mieszaninę rozpuszczalników, która przenosi mieszaninę przez kolumnę wypełnioną fazą stacjonarną.

Szczególnie cenna jest kolumnowa chromatografia adsorpcyjna w przypadku złożonych mieszanin stosunkowo niewielkich ilości substancji, których rozdzielenie za pomocą krystalizacji



Monitoring Środowiska

Wyodrębnianie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z gleby

czy destylacji jest praktycznie nieosiągalne, zwłaszcza, gdy chodzi o związki wysokowrzące i wrażliwe na działanie temperatury. Z tych samych powodów metodę kolumnowej chromatografii adsorpcyjnej stosuje się do rozdzielania szczególnie złożonych mieszanin związków pochodzących ze źródeł naturalnych.

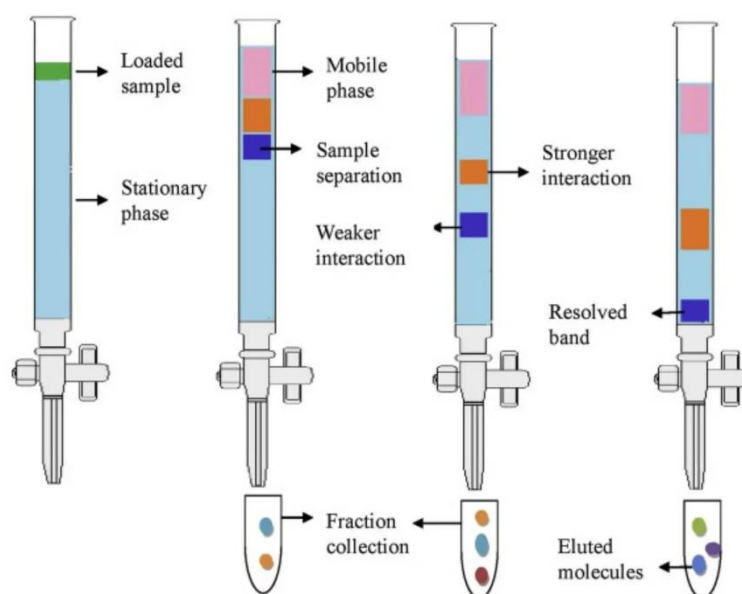
W chromatografii cieczowej występują konkurencyjne oddziaływania między próbką (analit i matryca) a fazą stacjonarną (adsorbent), między próbką a fazą ruchomą (rozpuszczalnik wymywający próbkę z adsorbentu) i między fazą ruchomą a stacjonarną. Mechanizm adsorpcyjny polega na zatrzymywaniu cząsteczek substancji na powierzchni adsorbentu (zwykle porowatego). W procesie tym biorą udział następujące oddziaływania międzycząsteczkowe:

- siły wynikające z oddziaływań między cząsteczkami mającymi trwałe moment dipolowy (oddziaływania dipol-dipol),
- siły wynikające z oddziaływań między cząsteczkami mającymi dipol i cząsteczkami, w których dipol jest indukowany przez sąsiadujące cząsteczki (oddziaływanie dipol-dipol indukowany),
- oddziaływania związane z tworzeniem wiązań wodorowych, specjalny rodzaj oddziaływania dipol-dipol między wodorem a atomem elektroujemnym, np. O, N, F.

Oddziaływania międzycząsteczkowe powodują, że rozdzielane substancje w niejednakowym stopniu zatrzymują się na adsorbencie. Im większe powinowactwo analitu do fazy stacjonarnej tym analit jest silniej przez nią zatrzymywany. Analit z adsorbentu wymywany jest fazą ruchomą. Im silniej zatrzymywany analit, tym później opuszcza kolumnę (większa retencja, czyli opóźnienie w stosunku do przepływu fazy ruchomej). Objętość fazy ruchomej potrzebna do jego wymycia nazywa się objętością retencji, a czas, w jakim analit zostaje wymyty z kolumny – czasem retencji. Objętość retencji i czas retencji określają się precyzyjnie, licząc od momentu naniesienia na kolumnę do momentu opuszczenia kolumny (maksimum stężenia analitu) przez analit o najwyższej wartości stężenia. Na **Rys. 2** przedstawiono etapy kolumnowej chromatografii adsorpcyjnej.

Monitoring Środowiska

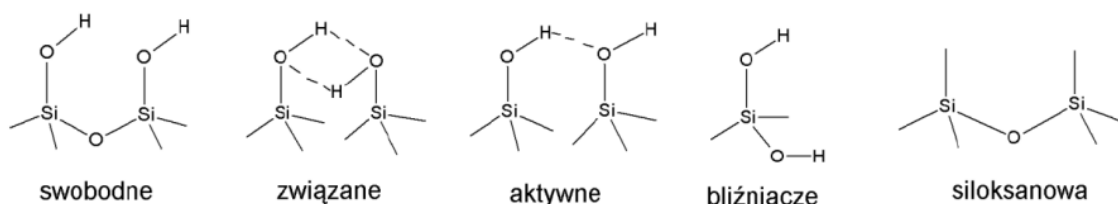
Wydzielanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z gleby



Rys. 2 Procedura kolumnowej chromatografii adsorpcyjnej

1.2. Adsorbenty

W chromatografii cieczowej używa się adsorbentów porowatych o powierzchniach od setek do tysiąca m²/g. Adsorbenty dzieli się na polarne i niepolarne. Do niepolarnych należą węgiel aktywny, węglowodory nasycone, polimery; do polarnych – żel krzemionkowy, krzemian magnezu, tlenek glinu. Żel krzemionkowy o ogólnym wzorze SiO₂ · nH₂O jest najczęściej stosowanym adsorbentem. O jego szerokim zastosowaniu decyduje łatwość otrzymywania przez polikondensację kwasu krzemowego, jak również możliwość łatwej modyfikacji jego właściwości powierzchniowych, takich jak struktura geometryczna porów czy modyfikacja chemiczna. Na powierzchni żelu krzemionkowego występują grupy -OH (silanolowe) o różnych właściwościach, w zależności od wzajemnej odległości i przestrzennego rozmieszczenia oraz grupy siloksanowe (Rys. 3).



Rys. 3 Grupy silanolowe (aktywne, bliźniacze, swobodne i związane) i siloksanowa, występujące na powierzchni żelu krzemionkowego



Monitoring Środowiska

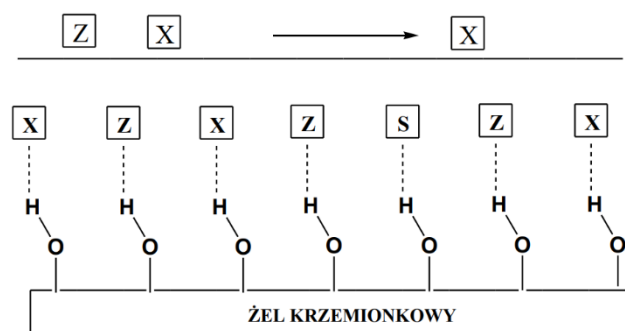
Wyodrębnianie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z gleby

Grupy silanolowe swobodne oraz aktywne stanowią centra silnie protonodonorowe, grupy silanolowe bliźniacze są centrami o słabych właściwościach protonodonorowych, a grupy związane, połączone ze sobą wiązaniem wodorowym mają właściwości protonoakceptorowe. Uważa się, że największą rolę w procesie adsorpcji odgrywają grupy swobodne i aktywne. Udział poszczególnych form występowania grup wodorotlenowych na powierzchni żelu krzemionkowego zależy od struktury geometrycznej porów. Żele szerokoporowate zawierają więcej swobodnych grup -OH, natomiast na powierzchni wąskoporowatych żeli więcej jest aktywnych i związanych grup -OH. Aktywność żelu krzemionkowego jak i innych adsorbentów nieorganicznych zwiększa się przez ogrzewanie w temperaturze 120-150 °C, aby częściowo usunąć zaadsorbowaną wodę. Wyższa temperatura w przypadku żelu krzemionkowego może powodować usuwanie grup wodorotlenowych z jego powierzchni. Siła adsorpcji związków organicznych na żelu krzemionkowym jest większa im większa jest ich polarność i rośnie w szeregu: węglowodory < halogenki alkilowe, aryłowe < etery (ROR) < aldehydy (RCHO) < ketony (R₂CO) < estry (RCOOR) < alkohole (ROH) < fenole (ArOH) < zasady azotowe (np. C₅H₅N, C₆H₅NH₂) < aminy III-rz. (R₃N) < aminy II-rz. i amidy < kwasy karboksylowe.

Na **Rys. 4** przedstawiono schemat oddziaływań między cząsteczkami analitów Z i X a powierzchnią adsorbentu – żelu krzemionkowego. Linia przerywaną oznaczono siły wynikające z różnego rodzaju oddziaływań występujących w chromatografii adsorpcyjnej i powodujących retencję (zatrzymanie). Przedstawiono substancję Z, która silniej oddziałuje z powierzchnią adsorbentu niż substancja X. W stanie równowagi, stosunek stężenia substancji Z w fazie stacjonarnej (adsorbent) do stężenia tej substancji w fazie ruchomej jest większy niż analogiczny stosunek dla X. Skoro substancji X jest relatywnie więcej w fazie ruchomej niż substancji Z, pierwsza opuści kolumnę substancja X.

Monitoring Środowiska

Wydrebnianie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z gleby



Rys. 4 Schemat mechanizmu adsorpcji substancji „X” i „Z” na żelu krzemionkowym (faza stacjonarna). Strzałką oznaczono kierunek przepływu fazy ruchomej „S” (rozpuszczalnik).

1.3. Fazy ruchome w chromatografii adsorpcyjnej

Zdolność rozpuszczalnika do wymywania substancji z adsorbentu zależy od jego siły oddziaływania z powierzchnią adsorbentu i zwana jest mocą elucyjną rozpuszczalnika (eluentu). Mechanizm tego oddziaływania jest taki sam jak przedstawiony wyżej dla substancji i adsorbentu. Silniejsza adsorpcja rozpuszczalnika na fazie stacjonarnej zmniejsza adsorpcję analitu. Rozpuszczalniki klasyfikuje się zgodnie ze wzrastającą zdolnością wymywania zaadsorbowanych substancji z adsorbentu (czyli zgodnie z ich wzrastającą mocą elucyjną) zestawiając (porządkując) je w tzw. szereg eluotropowy. W chromatografii z fazą stacjonarną polarną, np. z żelom krzemionkowym, o sile elucji decyduje polarność i polaryzowalność eluentu, więc szereg eluotropowy rozpuszczalników dla tej chromatografii adsorpcyjnej jest jednocześnie szeregiem o wzrastającej ich polarności. Wybór odpowiedniego rozpuszczalnika do rozdzielania wybranej mieszaniny związków nie jest łatwy. Zwykle stosuje się najpierw rozpuszczalnik o średniej mocy elucyjnej, następnie dla uzyskania właściwego rozdzielania zmienia się rozpuszczalnik na taki, który ma większą lub mniejszą moc elucyjną. Można mieszać dwa lub więcej rozpuszczalników dla uzyskania odpowiedniej siły elucji i selektywności rozdzielania. Szereg eluotropowy rozpuszczalników wg wzrastającej mocy elucyjnej, dla adsorbentów polarnych przedstawiono w Tabeli 2.



Monitoring Środowiska

Wyodrębnianie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z gleby

Tabela 2 Rozpuszczalniki uszeregowane zgodnie ze wzrastającą mocą elucyjną w chromatografii adsorpcyjnej na żelu krzemionkowym

Lp.	Rozpuszczalnik
1	n-Pentan
2	Eter naftowy
3	n-Heksan
4	Cykloheksan
5	Tetrachlorek węgla
6	Toluen
7	Eter dietylowy
8	Chloroform
9	Dichlorometan
10	Tetrahydrofuran
11	Aceton
12	Octan etylu
13	Acetonitryl
14	Pirydyna
15	Etanol
16	Metanol
17	Woda
18	Kwas octowy

Rozpuszczalniki stosowane w chromatografii ciekowej oprócz odpowiednich właściwości chemicznych muszą spełniać kilka wymogów: powinny być dostępne w handlu, niedrogie, czyste, bezpieczne w użyciu, mało reaktywne (nie niszczyć próbki, wypełnienia kolumny i przyrządu), umożliwiać detekcję próbki i być o odpowiedniej lepkości i lotności. Rozpuszczalniki niżej wrzące mają tendencję do tworzenia bąbków, mogą odparowywać w czasie rozdzielania i zmieniać niekontrolowanie skład fazy ruchomej. Rozpuszczalniki wyżej wrzące mają zwykle dużą lepkość i wymagają stosowania wysokich ciśnień dla uzyskania odpowiedniej szybkości przepływu, a po rozdziale, przy odparowywaniu eluatu, mogą powodować straty analitu.

1.4. Separacja metodą kolumnowej chromatografii adsorpcyjnej

W adsorpcyjnej chromatografii kolumnowej analizowane substancje w postaci roztworu są nanoszone na adsorbent wypełniający kolumnę. Wybór rozpuszczalnika zależy przede wszystkim od rozpuszczalności substancji chromatografowanych. Związek organiczny jest zawsze silniej adsorbowany z rozpuszczalnika niepolarnego niż polarnego – natomiast już zaadsorbowany



Monitoring Środowiska

Wyodrębnianie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z gleby

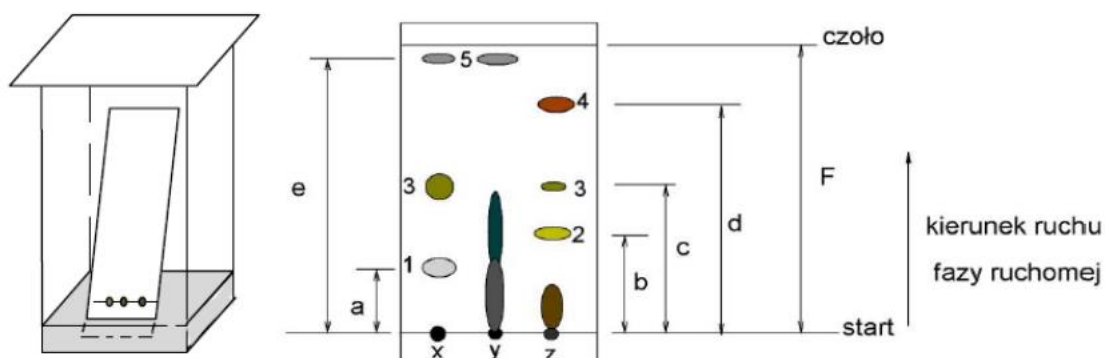
będzie tym silniej wypierany im bardziej polarny jest dany rozpuszczalnik. Następnie przemywając złożę (adsorbent w kolumnie) rozpuszczalnikiem rozwijamy chromatogram, czyli dzielimy mieszaninę na grupy związków lub poszczególne związki chemiczne i wmywamy je (eluujemy) z kolumny zbierając kolejne frakcje eluatu (rozpuszczalnika z eluującymi się związkami). Wmywanie można prowadzić jednym rozpuszczalnikiem lub mieszaniną o stałym składzie (elucja izokratyczna) lub kilkoma kolejno, albo mieszaniną rozpuszczalników o wzrastającej polarności (elucja gradientowa). Spływające z kolumny frakcje zbiera się oddzielnie. W ten sposób uzyskuje się rozdzielenie badanej mieszaniny na składniki nieadsorbowane i adsorbowane coraz silniej przez adsorbent. Poszczególne frakcje odparowuje się i bada innymi metodami.

Rozdzielając mieszaniny związków organicznych, a szczególnie substancji pochodzenia naturalnego, mimo wielu wskazówek, jakie można znaleźć w literaturze, zawsze wskazane jest wykonanie próby na wzorcach oznaczanych substancji a następnie próby z małą ilością materiału. Poza tym, jak w przypadku innych metod empirycznych, potrzebna jest zawsze pewna doza inwencji eksperymentatora. Niejednokrotnie selektywne rozdzielanie składników mieszaniny udaje się bardzo dobrze dopiero po uzyskaniu pewnego doświadczenia.

Zasadniczą częścią każdego zestawu do chromatografii kolumnowej jest kolumna ze szkła obojętnego, której wymiary są dostosowane do skali przeprowadzanego rozdzielania. Najczęściej mieszczą one od 10 do 100 g adsorbentu, co wystarcza do adsorpcji od 0,1 do kilku gramów substancji. Dla przyspieszenia elucji stosuje się słabe ssanie (pompka wodna) lub słabe tłoczenie. Napełnianie kolumny adsorbentem można przeprowadzać na sucho i na mokro. W metodzie na sucho adsorbent wsypuje się małymi porcjami do kolumny i ubija pałeczką szklaną. Następnie przemywa się adsorbent rozpuszczalnikiem, w którym nanosi się badaną mieszaninę. Metoda na mokro polega na wprowadzaniu do kolumny zawiesiny adsorbentu w rozpuszczalniku użytym do rozpuszczania substancji. W obu metodach napełnianie należy wykonać tak, by złożę adsorbentu było jednorodne, pozbawione pęcherzyków powietrza i tak ułożone, by nie zmieniało objętości w czasie rozdzielania. Powierzchnia adsorbentu powinna być stale pokryta płynem od chwili nalania pierwszej porcji rozpuszczalnika do zakończenia procesu. W przeciwnym razie złożę w kolumnie może łatwo wyschnąć, co uniemożliwi prowadzenie prawidłowej adsorpcji i może spowodować utlenianie się niektórych substancji.

1.5. Rozdzielenie metodą cienkowarstwowej chromatografii (TLC) adsorpcyjnej

Chromatografia cieczowa, polegająca na rozdzieleniu mieszaniny substancji na fazie stacjonarnej w postaci płaszczyzny, nazywa się chromatografią planarną. Fazą stacjonarną może być bibuła (chromatografia bibułowa) lub cienka, równomierna warstwa adsorbentu umieszczona na podłożu szklanym, metalowym czy z tworzywa sztucznego zwana płytką chromatograficzną (chromatografia cienkowarstwowa). Po zanurzeniu brzegu bibuły czy płytki chromatograficznej w fazie ruchomej, następuje przepływ fazy ruchomej wymuszony przez siły kapilarne. Substancje naniesione na płytkę będą przesuwają się wraz z fazą ruchomą (**rozwijanie chromatogramu**) lub pozostaną na miejscu naniesienia, jeśli moc elucyjna zastosowanej fazy ruchomej będzie niewystarczająca. Prędkość, z jaką substancje będą przesuwają się z fazą ruchomą, zależy od ich wzajemnego oddziaływania z fazą stacjonarną i fazą ruchomą oraz oddziaływania fazy ruchomej z fazą stacjonarną. Jeśli różnice w prędkości poruszania się poszczególnych substancji będą wystarczające, po pewnym czasie każda z substancji znajdzie się w innym miejscu płytki chromatograficznej – nastąpi rozdzielenie. Miejsce położenia substancji na płytce chromatograficznej określa **współczynnik opóźnienia oznaczany symbolem R_f , który wyraża stosunek drogi przebytej przez substancję do drogi przebytej przez fazę ruchomą**. Wartość R_f jest wielkością charakterystyczną dla danej substancji i układu chromatograficznego: fazy stacjonarnej i fazy ruchomej. Na **Rys. 5** przedstawiono komorę chromatograficzną z zanurzoną płytką z naniesionymi próbkami. Obok przedstawiono rozwinięty i wywołany chromatogram próbek x, y i z.



Rys. 5 Komora chromatograficzna z zanurzoną płytką i chromatogram TLC próbek x, y i z



Monitoring Środowiska

Wyodrębnianie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z gleby

Współczynniki R_f dla poszczególnych substancji wynoszą:

- dla substancji 1: $R_f = \frac{a}{F}$,
- dla substancji 2: $R_f = \frac{b}{F}$,
- dla substancji 3: $R_f = \frac{c}{F}$,
- dla substancji 4: $R_f = \frac{d}{F}$,
- dla substancji 5: $R_f = \frac{e}{F}$.

Dla substancji bezbarwnych istnieje szereg metod wizualizacji ich miejsca położenia na płycie chromatograficznej (**wywoływanie chromatogramu**). Metody te zależą od właściwości chemicznych i fizycznych badanych substancji. Bardzo często wywoływanie chromatogramu polega na przeprowadzeniu reakcji barwnych. Inną metodą jest zwęglanie substancji, absorpcja par jodu czy wizualizacja pod lampą UV. Substancje barwne nie wymagają wywoływania.

Na chromatogramie TLC próbek x, y i z (**Rys. 5**) należy zauważyć, że:

- plamy od 1 do 5 odpowiadają prawdopodobnie pojedynczym substancjom 1-5,
- substancja 1 znajduje się w próbce x,
- substancja 2 i 4 znajduje się w próbce z,
- substancja 3 znajduje się w próbce x i z (ta sama wartość R_f),
- substancja 5 znajduje się w próbce x i y (ta sama wartość R_f),
- pozostałe plamy odpowiadają nierozdzielonym substancjom, identyfikacja nie jest możliwa,
- plamy na starcie pochodzą od substancji nieoddziaływających z fazą ruchomą, za to silnie adsorbowanych przez fazę stacjonarną,
- pojedyncza plama nie musi odpowiadać jednej substancji, dopiero gdy plama jest pojedyncza na chromatogramach TLC uzyskanych w różnych układach chromatograficznych, możemy założyć, że odpowiada jednej substancji.

2. Cel ćwiczenia

Wyodrębnianie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z gleby poprzez zastosowanie ekstrakcji rozpuszczalnikiem i kolumnowej chromatografii adsorpcyjnej, następnie identyfikacja wyodrębnionych WWA.



Monitoring Środowiska

Wyodrębnianie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z gleby

3. Wykonanie ćwiczenia

3.1. Ekstrakcja gleby i przygotowanie ekstraktu do rozdzielania chromatograficznego

1. Odważyć próbkę o masie ok. 20 g (zanotować dokładną masę próbki).
2. Naważkę gleby umieścić w kolbie stożkowej o pojemności 100 ml.
3. Dodać 50 ml wcześniej przygotowanej mieszaniny eteru naftowego i dichlorometanu (3:2, v:v).
4. Kolbę umieścić w łaźni ultradźwiękowej na 15 min. W międzyczasie przejść do punktu ćwiczeń

3.2. Przygotowanie kolumny do rozdzielania.

5. Następnie osad zdekantować, ekstrakt przesączyć przez bezwodny siarczan sodu umieszczony na sączku z bibuły filtracyjnej do kolbki gruszkowej o pojemności 200 ml.
6. Do gleby dodać świeżą porcję 25 ml mieszaniny eteru naftowego i dichlorometanu (3:2, v:v) i ekstrahować w łaźni ultradźwiękowej 10 min.
7. Następnie przesączyć przez ten sam sączek – czynności z punktów 6-7 powtórzyć.
8. Do połączonych ekstraktów dodać 0,2 ml toluenu i odparować na odparowywaczu obrotowym, przy temperaturze łaźni wodnej nie przekraczającej 30 °C, do objętości poniżej 0,5 ml (warstwa „oleju” na ściankach kolbki).
9. Do ekstraktu dodać 5 ml eteru naftowego. W razie trudności w rozpuszczeniu ekstraktu można dodać 1-2 krople toluenu i użyć vortexu do wymieszania zawartości kolby, w ostateczności próbkę można nanieść na kolumnę w postaci zawiesiny.

3.2. Przygotowanie kolumny do rozdzielania

1. W zlewce o pojemności 50 ml umieścić około 10 gramów żelu krzemionkowego, zalać go taką ilością eteru naftowego, aby słup ciecchy nad zawiesiną wynosił ok. 1 cm. Zawartość kolbki mieszać ruchem łagodnym, tak by usunąć pęcherzyki powietrza z zawiesiny.
2. W kolumnie chromatograficznej umieścić na przegrodzie ze szkła 1 krążek bibuły filtracyjnej.
3. Następnie podstawić pod wylot kolumny zlewkę na rozpuszczalnik z przemywania kolumny.
4. Zawiesinę żelu krzemionkowego lekko wymieszać i wlać przez lejek do kolumny unikając zbędnego napowietrzania. Wlać tyle zawiesiny, aby złożo adsorbentu po ułożeniu się w kolumnie miało wysokość 6 do 8 cm.
5. Po napełnieniu i ułożeniu adsorbentu w kolumnie na wierzch złoża nałożyć krążek bibuły.



Monitoring Środowiska

Wydrebnianie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z gleby

6. Następnie przemyć zawartość kolumny 20 ml eteru naftowego (lub więcej aż do osiągnięcia stałej wysokości złoża w kolumnie) i zamknąć wypływ z kolumny. **Należy pamiętać, by warstwa adsorbentu była stale pokryta rozpuszczalnikiem!**

3.3 Nanoszenie ekstraktu na kolumnę

1. Wypuścić z kolumny nadmiar eteru naftowego, tak by wysokość cieczy nad złożem wynosiła 1-2 mm.
2. Nanieść ekstrakt uzyskany w etapie 3.1. na czoło kolumny, wlewając go powoli pipetą Pasteura najlepiej po ściance kolumny tuż nad powierzchnią żelu. Od momentu naniesienia ekstraktu na kolumnę rozpoczyna się zbieranie frakcji. Należy zmienić odbieralnik pod wylotem kolumny.
3. Po upływie kilku minut, wlać ostrożnie po ściance kolumny 1 ml eteru naftowego i chwilę odczekać - czynność tę powtórzyć, używając następną, 1 ml porcję eteru naftowego.
4. Dodać pozostałą objętość eteru naftowego, wynikającą z rozmiarów złoża i warunków rozdzielania podanych poniżej i prowadzić wymywanie frakcji węglowodorów alifatycznych i WWA.

3.4. Warunki rozdzielania

Adsorbent - żel krzemionkowy MN-Kieselgel 60 o wielkości ziarna poniżej 0,08 mm.

- Wymiary złoża adsorbentu - 1 cm × 6 cm.

Elucja:

- I frakcja - 12 ml eteru naftowego, zawiera węglowodory alifatyczne,
- II frakcja - 25 ml mieszaniny eteru naftowego i toluenu (9:1,v:v), zawiera WWA.

Jeśli wysokość złoża jest inna objętości frakcji należy proporcjonalnie zmienić.

3.5. Ocena jakości rozdzielania za pomocą chromatografii cienkowarstwowej

Frakcje II (WWA) przenieść do kolby okrągłodennej o pojemności 50 ml, a następnie odparować do sucha na odparowywaczu obrotowym (w miarę czasu przygotować płytki do TLC). Suchą pozostałość ponownie rozpuścić w 1 ml mieszaniny eteru naftowego i toluenu (9:1,v:v).



Monitoring Środowiska

Wyodrębnianie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z gleby

Warunki analizy TLC:

płytki z żelom krzemionkowym 60 na folii aluminiowej, faza ruchoma – cykloheksan:toluen (67:33,v:v), wizualizacja pod lampą UV.

Wykonanie analizy TLC:

1. Dopasować rozmiary płytki do komory chromatograficznej.
2. Narysować delikatnie ołówkiem linię startu w odległości ok. 1 cm od brzegu płytki i zaznaczyć na niej punkty nanoszenia roztworów (punkty opisać delikatnie ołówkiem).
3. Za pomocą kapilar nanieść na płytkę: roztwór wzorców WWA, frakcji WWA i frakcji węglowodorów alifatycznych, uważając, by plamka nie miała średnicy większej niż 5 mm; im mniejsza średnica, tym mniejsze rozmycie plamki w czasie rozwijania chromatogramu.
4. Wlać do komory chromatograficznej niewielką objętość fazy ruchomej, aby pokryć dno komory. Należy uważać, aby po wstawieniu płytki, plamki naniesionych substancji nie dotykały lustra cieczy.
5. Delikatnie, przy pomocy pęsety, wstawić płytkę chromatograficzną z naniesionymi substancjami do komory chromatograficznej; boki płytki nie mogą dotykać ścian komory.
6. Komorę zamknąć i rozwijać chromatogram.
7. Płytkę wyjąć z komory, gdy czoło rozpuszczalnika będzie w odległości mniejszej niż 1 cm od brzegu.
8. Zaznaczyć ołówkiem czoło fazy ruchomej i wysuszyć płytkę za pomocą suszarki elektrycznej.
9. Przy pomocy pęsety umieścić płytkę pod lampą UV i ołówkiem obrysować widoczne plamki.
10. Wyznaczyć współczynnik R_f dla wszystkich plamek.
11. Na podstawie chromatogramu TLC ocenić jakość rozdzielania WWA i węglowodorów alifatycznych na kolumnie z żelom krzemionkowym.

4. Wykonanie sprawozdania

Sprawozdanie powinno składać się z następujących części:

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



Monitoring Środowiska

Wyodrębnianie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z gleby

5. Zakres wymaganych wiadomości:

- Podstawowe wiadomości o glebie,
- źródła zanieczyszczenia gleb,
- WWA (przykłady, źródła emisji, toksyczność),
- etapy procesu analitycznego,
- pobieranie próbek do analizy,
- przygotowanie próbek do analizy,
- zadania rachunkowe z opracowania „Monitoring środowiska – obliczenia”,
- adsorpcyjna chromatografia kolumnowa,
- chromatografia cienkowarstwowa (TLC).

Literatura

Skorzystać należy z opracowania „Monitoring jakości gleby” oraz ze skryptów „Monitoring i Analityka zanieczyszczeń w środowisku” i „Techniki separacyjne”.

Normy prawne:

1. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. w sprawie sposobu prowadzenia oceny zanieczyszczenia powierzchni ziemi, Dz.U. 2016 poz. 1395.
2. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. w sprawie rejestru historycznych zanieczyszczeń powierzchni ziemi, Dz.U. 2016 poz. 1397.
3. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 22 lipca 2019 r. w sprawie kryteriów oceny wystąpienia szkody w środowisku, Dz.U. 2019 poz. 1383
4. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. w sprawie rejestru szkód w środowisku, Dz.U. 2016 poz. 1398.
5. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. w sprawie działań naprawczych, Dz.U. 2016 poz. 1396.



Monitoring Środowiska

Wyodrębnianie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z gleby

Niezbędne szkło i odczynniki:

- Próbkę gleby skażona WWA,
- żel krzemionkowy,
- bibuła filtracyjna,
- linijka,
- nożyczki,
- płytki TLC,
- ołówek,
- kapilary,
- komory do rozwijania chromatogramów,
- suszarka,
- pęseta,
- szklana kolumna chromatograficzna,
- eter naftowy,
- mieszanina eteru naftowego i toluenu (9:1,v:v),
- mieszanina eteru naftowego i dichlorometanu (3:2, v:v),
- bezwodny siarczan sodu,
- toluen,
- filtr papierowy,
- 2 x lejek,
- 5 x zlewka 50 ml,
- kolba gruszkowa 200 ml,
- kolba stożkowa 100 ml,
- kolba okrągłodenna 50 ml,
- cylinder miarowy 50 ml,
- cylinder miarowy 25 ml,
- cylinder miarowy 10 ml,
- szklana pipeta 1 ml,
- szklana pipeta 5 ml,
- szklana pipeta 10 ml,
- pipety Pasteura.