



Uniwersytet
Gdański



Katedra Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie 4

Zastosowanie metody wzorca wewnętrznego do analizy ilościowej WWA
techniką GC-FID

Gdańsk, 2023



Metody Separacyjne

Zastosowanie metody wzorca wewnętrznego do analizy ilościowej WWA techniką GC-FID

I. Wprowadzenie

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) to obszerna grupa związków chemicznych o budowie pierścieniowej, charakteryzujących się zbliżonymi własnościami fizykochemicznymi. Choć znanych jest ponad 100 różnych WWA, najczęściej w środowisku występuje około 17 związków chemicznych. Struktury i nazewnictwo wybranych WWA przedstawiono w Tabeli 1. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne należą do grupy najpowszechniej występujących, trwałych zanieczyszczeń organicznych. Głównymi źródłami WWA są: produkty niepełnego spalania paliw kopalnych, lotne pyły i popioły powstające ze spalania paliw lub utylizacji odpadów oraz przemysł ciężki (koksownie, rafinerie, huty metali). Szacuje się, iż szczególnie w okresie zimowym, poważnym źródłem WWA w środowisku jest tzw. niska emisja, pochodząca z indywidualnych źródeł ciepła. Jednak najpoważniejszy udział w emisji WWA na terenach zurbanizowanych ma transport samochodowy. Wśród źródeł naturalnych wymienia się pożary lasów i wybuchy wulkanów oraz procesy przemiany materii bakterii, glonów i roślin wyższych. WWA pochodzące ze źródeł antropogenicznych nigdy nie występują w środowisku w postaci pojedynczych związków – zawsze tworzą mieszaniny wieloskładnikowe o zróżnicowanym składzie, zależnym od rodzaju materiału spalanego oraz warunków, w jakich zachodzi proces spalania.




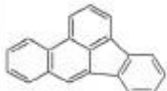
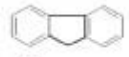

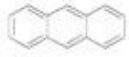
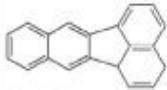
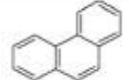
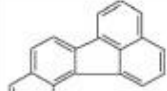
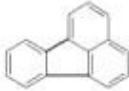
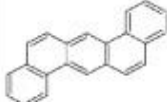


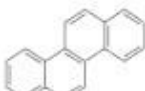
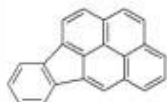
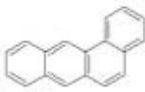
Najistotniejszym ze zdrowotnego punktu widzenia skutkiem oddziaływania WWA na organizm jest zdolność niektórych z nich do wywoływania zmian nowotworowych. Z tego względu WWA podzielono na nieaktywne, mniej aktywne i bardzo aktywne. Liczne badania dostarczyły dostatecznej ilości danych, by WWA o ilości pierścieni powyżej 3 uznać za rakotwórcze oraz mutagenne. Do tych związków należą m.in. benzo(a)piren, dibenzo(a,h)antracen, benzo(a)antracen, benzo(b)fluoranten, czy dibenzo(a,e)piren. WWA są metabolizowane przez mikrosomalne enzymy cytochromu P 450 do związków mogących tworzyć trwałe połączenia z DNA (np. epoksydy), co w konsekwencji może prowadzić do wysoce prawdopodobnego procesu nowotworzenia. W celu systematycznej oceny toksyczności wszystkich rakotwórczych WWA, wprowadzono tzw. względny współczynnik rakotwórczości (k), odnoszący się do rakotwórczości benzo[a]pirenu (BaP), dla którego przyjęto wartość równą 1. Obecnie jako miarę narażenia na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne przyjmuje się wskaźnik będący sumą iloczynów stężeń 9 WWA i ich względnych współczynników rakotwórczości (Tabela 2).



Metody Separacyjne

Zastosowanie metody wzorca wewnętrznego do analizy ilościowej WWA techniką GC-FID

Tabela 1. Wybrane wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne.

Wielopierścieniowy węglowodór aromatyczny	Wzór strukturalny i sumaryczny	Masa cząsteczkowa	Wielopierścieniowy węglowodór aromatyczny	Wzór strukturalny i sumaryczny	Masa cząsteczkowa
Acenaften	 C ₁₂ H ₁₀	154,2	Benzo(a)piren	 C ₂₀ H ₁₂	252,3
Acenaftylen	 C ₁₂ H ₈	154,2	Benzo(b)fluoranten	 C ₂₀ H ₁₂	252,3
Fluoren	 C ₁₃ H ₁₀	166,2	Benzo(a)piren	 C ₂₀ H ₁₂	252,3
Antracen	 C ₁₄ H ₁₀	178,2	Benzo(k)fluoranten	 C ₂₀ H ₁₂	252,3
Fenantren	 C ₁₄ H ₁₀	178,2	Benzo(j)fluoranten	 C ₂₀ H ₁₂	252,3
Fluoranten	 C ₁₆ H ₁₀	202,3	Dibenzo(a,h)antracen	 C ₂₂ H ₁₄	278,4
Piren	 C ₁₆ H ₁₀	202,3	Benzo(ghi)perylen	 C ₂₂ H ₁₂	276,3
Chryzen	 C ₁₈ H ₁₂	228,3	Indeno(1,2,3-cd)piren	 C ₂₂ H ₁₂	276,3
Benzo(a)antracen	 C ₁₈ H ₁₂	228,3			



Metody Separacyjne

Zastosowanie metody wzorca wewnętrznego do analizy ilościowej WWA techniką GC-FID

WWA emitowane z różnych źródeł ulegają stopniowej dystrybucji w środowisku, gdzie ostatecznie deponowane są w glebach (90%) oraz, ze względu na bardzo słabą rozpuszczalność w wodzie, w osadach dennych (9%). Oprócz depozycji WWA z powietrza, związki te trafiają do gleby razem z wodami spływnymi. Wody spływne wymywają np. nawierzchnię dróg, na których znajdują się duże ilości WWA pochodzące: ze spalin samochodowych, ze ścierania opon gumowych przy hamowaniu i z samego asfaltu bogatego we frakcje węglowodorów aromatycznych. Dodatkowym źródłem są także niekontrolowane zrzuty ścieków przemysłowych i bytowo-gospodarczych, a także odcieki ze składowisk odpadów.

Tabela 2. Porównanie różnych technik ekstrakcji cieczą (J. Namieśnik, Z. Jamrogiewicz, M. Pilarczyk, L. Torres, *Przygotowanie próbek środowiskowych do analiz*, WNT Warszawa, 2000)

Substancja	Względny współczynnik rakotwórczości k
Dibenzo(a,h)antracen	5
Benzo(a)piren	1
Benzo(a)antracen	0,1
Benzo(b)fluoranten	0,1
Benzo(k)fluoranten	0,1
Indeno(1,2,3-c,d)piren	0,1
Antracen	0,01
Chryzen	0,01
Benzo(g,h,i)perylene	0,01

II. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z klasyczną techniką ekstrakcji ciało stałe-ciecz wspomaganą ultradźwiękami związków organicznych z matrycy środowiskowej oraz analiza ilościowa wyizolowanych z gleby węglowodorów aromatycznych (pirenu oraz antracenu) metodą wzorca wewnętrznego (wzorzec – 2-metyloantracen).



Metody Separacyjne

Zastosowanie metody wzorca wewnętrznego do analizy ilościowej WWA techniką GC-FID

III. Wykonanie ćwiczenia

Wyznaczanie współczynników odpowiedzi

Korzystając z roztworów podstawowych pirenu, antracenu i 2-metyloantracenu (o stężeniu 5 mg/ml) należy przygotować roztwory wzorcowe pojedynczych związków jak i ich mieszaninę o stężeniu wskazanym przez prowadzącego. Do rozcieńczeń wykorzystać chlorek metylenu. Wykonać analizy GC każdego roztworu roboczego w celu wyznaczenia czasów retencji związków. Następnie przeprowadzić trzykrotnie analizę chromatograficzną mieszaniny trzech WWA w celu wyznaczenia współczynników odpowiedzi (f). Z każdego przebiegu chromatograficznego wyznaczyć oddzielne wartości f dla antracenu i pirenu.

Ekstrakcja gleby

Próbki gleby są zanieczyszczone pirenem i antracenenem. Przewidywana zawartość analitów mieści się w przedziale od **1 do 100 mg/kg suchej masy gleby**. Naważyć próbkę o masie 10 g i umieścić w kolbie stożkowej o pojemności 100 ml. Do próbki dodać odpowiednią ilość wzorca wewnętrznego o stężeniu 5 mg/ml - 2-metyloantracenu. Ilość dodanego wzorca obliczają sami studenci i konsultują z prowadzącym ćwiczenia. Następnie dodać 50 ml mieszaniny eteru naftowego i dichlorometanu (3:2, v/v). Kolbę umieścić w łaźni ultradźwiękowej na 15 min. Następnie ekstrakt zdekantować znad osadu, przesączyć przez bezwodny siarczan sodu umieszczony na sączku z bibuły filtracyjnej do kolbki okrągłodennej lub sercówki o pojemności 100 ml. Do gleby dodać świeżą porcję mieszaniny eteru naftowego i dichlorometanu (25 ml) i ekstrahować w łaźni ultradźwiękowej przez kolejne 10 min. Otrzymany ekstrakt przesączyć przez ten sam sączek. Połączone ekstrakty odparować na odparowywaczu obrotowym, w temperaturze łaźni wodnej nieprzekraczającej 40°C, do objętości 1 ml. W razie potrzeby wprowadzić do kolby świeżą porcję mieszaniny ekstrakcyjnej (10 ml), ruchem kolistym opłukać ścianki naczynia i przesączyć przez nowy sączek zawartość do czystej kolby. Zatężyć ponownie do 1 ml. Trzykrotnie wykonać analizę GC otrzymanego ekstraktu. Jeżeli ilość wzorca wewnętrznego była odpowiednia obliczyć zawartość piranu i antracenu w próbce gleby (dla każdego przebiegu chromatograficznego oddzielnie). Jeżeli dodano za mało lub za dużo wzorca wewnętrznego w stosunku do zawartości analitów pobrać kolejną próbkę gleby i powtórzyć całą procedurę zmieniając ilość dodanego wzorca wewnętrznego.



Metody Separacyjne

Zastosowanie metody wzorca wewnętrznego do analizy ilościowej WWA techniką GC-FID

Warunki analizy GC:

- Chromatograf gazowy z detektorem FID
- Kolumna chromatograficzna RTX-5 30 m, 0,25 mm średnica wewnętrzna, 0,25 μm grubość fazy stacjonarnej,
- Program temperaturowy: 200 - 300°C, narost 6°C/min,
- Temperatura dozownika: 300°C,
- Temperatura detektora: 300°C,
- Dzielnik przepływu: 1:20,
- Gaz nośny: argon, stały przepływ 1mL/min,
- Ciśnienie powietrza: 350 kPa, wodoru: 35 kPa.

W celu obliczenia zawartości antracenu i pirenu w glebie, należy zastosować uśrednione z trzech przebiegów chromatograficznych wartości współczynników f. Zawartość tych WWA podajemy jako średnią w przeliczeniu na kg gleby. Uzyskane wartości porównujemy z dopuszczalnymi zawartościami WWA w glebie, podanymi w odpowiednich normach prawnych. W sprawozdaniu umieszczamy także chromatogramy i przeliczenia wykonane na zajęciach.

Szkło i odczynniki

- roztwory wzorcowe 2-metyloantracenu, pirenu oraz antracenu, o stężeniu 5 mg/ml:
- eter naftowy destylowany,
- dichlorometan destylowany,
- bezwodny siarczan(VI) sodu
- rozpuszczalniki do mycia.
- kolba stożkowa o poj. 50 ml 3 szt,
- kolba stożkowa o poj. 100 ml 3 szt,
- cylindry miarowe o poj. 10 ml - 1 szt., 25 ml - 1 szt., 50 ml - 1 szt,
- pipeta z tłoczkiem lub strzykawka szklana o poj. 2 ml - 2 szt,
- lejek szklany - 3 szt,
- kolba okrągłodenna poj. 100 ml - 3 szt,
- kolba okrągłodenna poj. 250 ml - 3 szt,
- łyżka metalowa - 2 szt,
- moździerz porcelanowy - 1 szt,
- sączi z bibuły filtracyjnej,



Metody Separacyjne

Zastosowanie metody wzorca wewnętrznego do analizy ilościowej WWA techniką GC-FID

- naczynie szklane na próbkę gleby,
- strzykawka o poj. 10 μ l do GC,
- strzykawka o poj. 100 μ l do roztworu wzorców,
- odparowywacz obrotowy,
- rękawice ochronne, lateksowe.

Literatura

1. Stepnowski P., Synak E., Szafranek B., Kaczyński Z. Techniki separacyjne Wydawnictwo UG 2010
2. Szczepaniak W., Metody instrumentalne w analizie chemicznej. W-wa, PWN, 1996.
3. Kocjan R. Chemia analityczna, podręcznik dla studentów, W-wa, PZWL, 2000, tom 2.
4. Staszewski R. Kontrola chemicznych zanieczyszczeń środowiska, Podstawy teoretyczne z ćwiczeniami laboratoryjnymi, Politechnika Gdańska, Gdańsk, 1990.
5. Namieśnik J. Metody instrumentalne w kontroli zanieczyszczeń środowiska. J., Politechnika Gdańska, Gdańsk, 1992.
6. http://chemia.ug.edu.pl/sites/default/files/_nodes/strona-chemia/17399/files/slady_gc.pdf