



ANALIZA ŚLADOWYCH ZANIECZYSZCZEŃ ŚRODOWISKA I ROK OŚ II

Ćwiczenie 2

Zastosowanie ekstrakcji do fazy stałej (Solid Phase Extraction, SPE) do wydzielenia frakcji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z wody i oznaczanie ich techniką chromatografii gazowej (GC/FID)

1. Wprowadzenie

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, powstające z materiału organicznego przez pirolizę lub niepełne spalanie, emitowane są do środowiska naturalnego z różnych źródeł. Występują one w środowisku naturalnym w niewielkim stężeniu, jednak ze względu na toksyczne a nawet rakotwórcze działanie niektórych, wymagane jest oznaczanie ich, zwłaszcza w wodzie pitnej.

Występowanie WWA w śladowych ilościach (stężenia na poziomie ppb lub ppm) wymaga stosowania selektywnych metod izolacji i zateżniania oraz technik oznaczania charakteryzujących się dużą czułością. Takie wymagania spełnia metoda zateżniania za pomocą ekstrakcji do fazy stałej oraz analiza metodami chromatografii cieczowej lub kapilarnej chromatografii gazowej.

Rozwój techniki przygotowania próbek poprzez ekstrakcję do fazy stałej nastąpił po pojawieniu się łatwo dostępnych i trwałych sorbentów o różnorodnych właściwościach chemicznych. Szczególne znaczenie ma zastosowanie krzemionki jako nośnika różnych grup funkcyjnych. Zmodyfikowanie powierzchni żelu krzemionkowego poprzez zastąpienie wolnych grup SiOH grupą cyjanową (CN), aminową (NH₂) czy diolową (COHCOH) powoduje zmniejszenie siły oddziaływań silnie polarnych związków z krzemionką i umożliwia ich ekstrakcję. Ten typ sorbentów nosi nazwę faz normalnych (NP). Zastąpienie grup silanolowych

grupami oktylowymi (C-8), oktadecylowymi (C-18) czy alkilofenyłowymi (R-C₆H₅) sprawia, że krzemionka staje się sorbentem niepolarnym i nosi nazwę faz odwróconych (RP). W tym przypadku powstają silne, ale odwracalne oddziaływania niepolarnych lub słabo polarnych substancji ze zmodyfikowaną powierzchnią krzemionki, co umożliwia ich ekstrakcję z polarnego rozpuszczalnika.

Metoda ekstrakcji do fazy stałej znalazła szerokie zastosowanie, zwłaszcza do izolowania substancji organicznych z roztworów wodnych. Do ekstrakcji WWA z wody stosowane są z powodzeniem niepolarne fazy oktadecylowe (C-18), same lub w połączeniu z polarnymi, np. aminopropylową.

Zatężanie analitu z wody metodą ekstrakcji do fazy stałej z zastosowaniem odwróconych faz C-18 obejmuje kilka etapów.

Pierwszy etap to przemycie kolumnienki wraz z wypełnieniem rozpuszczalnikami mającymi wartość eluotropową większą niż stosowane eluenty. Usuwa się w ten sposób substancje (alkeny C₁₆-C₂₄, alkiloftalany, alkany, silanole, siloksany), które mogą się wyekstrahować z gotowych kolumnienek, a których ilość zależy od producenta. Związki silanolowe są wynikiem hydrolizy wiązania między grupami silanolowymi a podstawnikami modyfikującymi krzemionkę, dlatego należy bezwzględnie unikać stosowania eluentów mogących ją powodować. Objętość rozpuszczalników służących do przemywania kolumnienek należy ustalić doświadczalnie, najczęściej zaleca się wstępne przemywanie rozpuszczalnikami stosowanymi do elucji w objętości 5-10 razy większej od masy wypełnienia.

Następnym etapem jest kondycjonowanie (solwatacja) wypełnienia kolumnienki (złoża sorbentu) polegające na przygotowaniu powierzchni sorbentu do efektywnej izolacji i wzbogacania analitów z wody. Żel krzemionkowy modyfikowany fazą oktadecylową ma własności lipofilne (fazy RP nie są zwilżane wodą), dlatego złożo najpierw przemywa się metanolem lub 2-propanolem a następnie mieszaniną wody i 2-propanolu. Do kondycjonowania stosuje się zwykle 5 – 10 objętości pustych używanej kolumnienki (1 objętość pusta = 1,0 – 1,2 µl/mg sorbentu). 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.

Kolejnym etapem jest naniesienie na kolumnienkę próbki wody. Jeśli próbka zawiera zawiesiny, przed naniesieniem należy ją odwirować lub przesączyć – aby uniknąć zatkania filtru wlotowego kolumnienki. Badaną wodę nanosi się z dodatkiem 1-5% metanolu lub 5 – 15%

2-propanolu. Dodatek alkoholu do wody badanej powoduje, że powierzchnia sorbentu jest aktywna (łańcuchy węglowodorowe wyprostowane) podczas wszystkich etapów zagęszczania (dynamiczna solwatacja), co umożliwia przepuszczenie przez kolumnę większej objętości próbki bez przebicia (przekroczenia pojemności sorpcyjnej) złoża oraz zmniejsza adsorpcję analitów na ściankach kolumny. Roztwory wodne zawierające analit przepuszcza się przez kolumnę z szybkością 1 – 25 cm³/min przy stosowaniu odpowiedniego podciśnienia (pompka wodna) lub nadciśnienia (sprężony gaz obojętny).

Kolejny etap obejmuje usunięcie z przestrzeni między cząstkami sorbentu oraz z wnętrza jego porów substancji niezwiązanych przez przemycie czystym 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 przemycanego usuwa się przez suszenie strumieniem powietrza (zasysanym przez pompkę wodną). Czas suszenia zależy od lotności rozpuszczalnika i masy sorbentu i wynosi od 1 – 20 minut. W przypadku rozpuszczalników wysokowrzących (w tym wody) suszenie przy użyciu podciśnienia może być niewystarczające i powinno go poprzedzić wirowanie. Odwirowanie rozpuszczalnika należy stosować, gdy mamy do czynienia z analitami lotnymi lub łatwo ulegającymi utlenieniu. Przy nielotnych analitach można zastosować również liofilizację.

Elucja analitów 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 (zawsze pierwszą porcję rozpuszczalnika wprowadza się bez użycia podciśnienia, pozwalając jej “wsiąknąć” w złoże). Można też wymywać substancje kolejno różnymi rozpuszczalnikami, różniącymi się siłą elucyjną - ekstrakcja sekwencyjna. Efektywność zagęszczania metodą SPE wyraża się współczynnikiem wzbogacenia analitu k , opisanego wzorem

$$k = V_w/V_E$$

gdzie: V_w - objętość wody przepuszczona przez sorbent,

V_E - objętość eluentu użyta do wymycia analitów.

Wzrost wartości współczynnika można osiągnąć przez zwiększenie objętości wody przepuszczanej przez sorbent lub przez zmniejszenie objętości eluentu. Zmniejszenie objętości

eluentu wiąże się z użyciem mniejszej ilości sorbentu. Użycie eluentu o większej sile wymywania też prowadzi do zmniejszenia jego objętości, ale może się wiązać z wymyciem interferentów.

W warunkach optymalnych wartość odzysku wyrażonego w % dla 16 WWA po zagęszczeniu i desorpcji z fazy RP wynosi ok. 90% przy współczynniku wzbogacenia 1000 dla próbek o objętości 0,5 do 1,0 dm³ wody.

Na rysunku przedstawiono zestaw do ekstrakcji do fazy stałej z zastosowaniem próżni z pompki wodnej.



2. Wykonanie ćwiczenia

2.1. 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).

2.2. Przygotowanie próbki do ekstrakcji

250 cm³ badanej wody umieścić w kolbie stożkowej o pojemności 500 cm³, dodać 2,5 cm³ roztworu wzorca wewnętrznego 9-metyloantracenu o stężeniu 128 µg/cm³ i zawartość kolby wymieszać.

2.3. Kondycjonowanie kolumny SPE C-18

Kolumnę C-18 podłączyć do odbieralnika (rys.1), przemyć 3 cm³ metanolu następnie 2 razy po 3 cm³ mieszaniny woda - metanol (9:1,v:v). Kolumnę należy kondycjonować powoli, nie dopuszczając do wysuszenia złoża.

Należy pamiętać, że warstwa sorbentu przed naniesieniem próbki musi być pokryta rozpuszczalnikiem!

2.4. Wprowadzenie próbki na kolumnę i ekstrakcja

Na przygotowaną kolumnę wprowadzić bez użycia próżni 2-3 cm³ próbki, podłączyć kolumnę do zbiornika i powoli, unikając zapowietrzania wlać do zbiornika resztę próbki wody. Próbkę przepuszczać przez kolumnę z prędkością 5-10 cm³/min, używając podciśnienia z pompki wodnej.

2.5. Przemycie kolumny i suszenie

Przepuścić powoli przez kolumnę 3 cm³ mieszaniny metanolu i wody dejonizowanej (1:1,v:v) a następnie suszyć pod próżnią 15-20 min.

2.6. Wymywanie frakcji WWA

Odłączyć kolumnę od zestawu, umieścić jej wylot w naczynku, do którego będzie zbierany eluat i całość umieścić w zlewce dla zabezpieczenia przed przewróceniem. Wprowadzić na kolumnę 2 razy po 500 µl dichlorometanu, przy czym pierwszej porcji pozwolić powoli “wsiąknąć” w złoże. Eluat w naczynku przenieść pod zestaw do odparowywania w strumieniu azotu i zatężyć do ok. 100 µl (*lub według wskazówek prowadzącego*). Po zebraniu eluatu kolumnę ponownie umieścić w zestawie (bez zbiornika na próbkę) i przemyć 4 razy po 500 µl dichlorometanu a następnie 2 razy po 3 cm³ metanolu, stosując niewielkie podciśnienie i wysuszyć.

2.7. Analiza właściwa WWA

Wydzieloną i zatężoną frakcję WWA analizować techniką chromatografii gazowej.

Warunki rozdziału:

- 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 50°C, narost 6°C/min do 300°C; 10 min izotermicznie w 300°C
- temperatura dozownika 320°C;
- temperatura detektora 320°C, czułość (range) 1×10^{-1} ;
- gaz nośny Ar, stały przepływ 1 ml/min, splitter 1:50

2.8. Obliczenie zawartości WWA w wodzie i sporządzenie sprawozdania

Należy obliczyć zawartości poszczególnych WWA oraz ich sumę w badanej próbce wody (w $\mu\text{g}/\text{dm}^3$) i porównać je ze standardami jakości wody. Wyniki umieścić w sprawozdaniu, w którym powinno się znajdować:

- zwięzły opis zastosowanych do izolacji WWA technik chromatograficznych i metody ilościowej,
- opis próbki,
- schemat blokowy, ideowy wykonania oznaczenia,
- wyniki, porównanie ze standardami wody, wnioski,
- na osobnej stronie przykłady obliczeń zawartości analitów.

2.9. Zakres wymaganych wiadomości

- etapy procesu analitycznego,
- pobieranie próbek do analizy,
- przygotowanie próbek do analizy,
- chromatografia gazowa, podstawowe pojęcia i definicje,
- ekstrakcja do fazy stałej,
- metoda wzorca wewnętrznego,
- WWA.

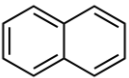
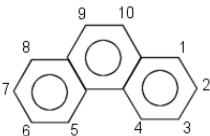
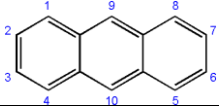
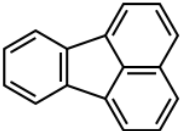
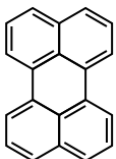
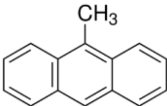
Literatura

1. Szczepaniak W., Metody instrumentalne w analizie chemicznej. W-wa, PWN, 1996.
2. Minczewski J., Marczenko Z., Chemia analityczna. W-wa, PWN, 1985, tom 3.
3. Ewing G. W., Metody instrumentalne w analizie chemicznej. W-wa, PWN, 1980.
4. Kocjan R. Chemia analityczna, podręcznik dla studentów, W-wa, PZWL, 2000, tom 2.

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny

- zestaw do SPE: kolumnienka CHROMABOND®C-18, 6 cm³/500 mg, kolba ssawkowa o poj. 500 cm³, zbiornik na wodę badaną o poj. ok 300 cm³, łącznik kolumnienki z kolbą ssawkową, pompka wodna, statyw;
- metanol destylowany,
- dichlorometan destylowany,
- metanol do mycia,
- woda dejonizowana,
- kolba stożkowa o poj. 500 cm³ z korkiem,
- kolbka miarowa o poj. 10 cm³,
- cylindry miarowe o poj. 10 cm³ - 3 szt., 250 cm³ - 1 szt.,
- pipeta o poj. 5 cm³ - 3 szt., o poj. 1 cm³ - 1 szt., o poj. 0,1 cm³ - 1 szt.,
- lejek szklany,
- kolbki stożkowe o poj. 25 cm³ - 3 szt.,
- naczynko zakręcane o poj. 2 cm³,
- mikrostrzykawka o poj. 10 µl
- chlorek metylenu do mycia strzykawki V = 25 ml

Tabela 1. Lista WWA, które mogą występować w badanej próbce wody

Nazwa	Wzór	Masa cząsteczkowa
naftalen		128.17
fenantren		178.23
antracen		178.23
fluoranten		202.25
perylene		252.31
9-metyloantracen (wzorzec wewnętrzny)		192.26