



ANALIZA ŚLADOWYCH ZANIECZYSZCZEŃ ŚRODOWISKA I ROK OŚ II

Ćwiczenie 3

Oznaczanie zawartości antracenu w próbce gleby metodą dodatku wzorca przy użyciu HPLC

1. Metoda dodatku wzorca

Procedura oznaczeń w metodzie dodatku wzorca jest następująca:

- pobieramy dwie identyczne próbki 1 i 2,
- przygotowujemy próbkę 1 i wykonujemy analizę chromatograficzną mierząc pole powierzchni lub wysokość piku analitu;
- do próbki 2 dodajemy **znaną ilość wzorca, który jest badaną substancją** (analitem), roztwór mieszamy i wykonujemy analizę chromatograficzną mierząc pole powierzchni (A) lub wysokość (h) piku analitu. Wartość parametru mierzonego wzrasta, a wzrost jest proporcjonalny do ilości dodanego wzorca.

Wynikiem dodania roztworu wzorca jest zmiana objętości próbki badanej, stąd należy skorygować stężenia. W przypadku stosowania mikrostrzykawk i wprowadzania niewielkich (rzędu kilku μl) objętości roztworu wzorca do analizowanej próbki, które nie wpływają w zasadniczy sposób na zmianę objętości próbki, taka korekta objętości nie jest konieczna.

Stężenie analitu można wyliczyć na podstawie układu dwóch równań:

$$\begin{cases} h_1 = ac \\ h_2 = a(c + c_w) \end{cases}$$

gdzie:

h_1 – wysokość piku analitu zmierzona dla próbki 1 bez dodatku wzorca,

a – współczynnik kierunkowy prostej,

c – stężenie analitu w badanej próbce,

h_2 – wysokość pików zmierzona dla próbki 2 po dodaniu wzorca,

c_w – stężenie wzorca w badanej próbce (**nie stężenie roztworu wzorcowego!!!** Należy obliczyć c_w uwzględniając stężenie roztworu wzorcowego, objętość roztworu wzorcowego dodanego do próbki oraz końcową objętość próbki 2).

Z równania pierwszego obliczymy a :

$$a = \frac{h_1}{c}$$

Po podstawieniu a do równania drugiego otrzymamy:

$$h_2 = \frac{h_1}{c}(c + c_w)$$

Po rozwiązaniu równania względem c otrzymamy równanie stosowane w metodzie dodatku wzorca:

$$c = \frac{h_1 c_w}{h_2 - h_1}$$

Gdzie c oznacza stężenie analitu w próbce poddanej analizie HPLC.

Próbką analizowaną metodą HPLC w ćwiczeniu jest ekstrakt metanolowy uzyskany z nawózki gleby o określonej masie. Należy obliczyć zawartość antracenu (mg/g masy gleby) w próbce gleby pamiętając o tym, że ekstrakt metanolowy jest dzielony na 2 części.

2. Wykonanie ćwiczenia

2.1. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z budową i działaniem chromatografu cieczowego HPLC oraz dokonanie analizy ilościowej antracenu metodą dodatku wzorca.

2.2. Opis metody

Analizę antracenu za pomocą HPLC prowadzi się w układzie faz odwróconych, tzn. na niepolarnej fazie stacjonarnej. Ten typ chromatografii jest najbardziej odpowiedni do rozdzielania mieszaniny związków niepolarnych lub słabo polarnych. Jako fazy ruchome używane są woda, acetonitryl, metanol oraz ich mieszaniny.

2.3. Warunki analizy HPLC

Chromatograf cieczowy HPLC wyposażony w detektor spektrofotometryczny UV z filtrem 254 nm oraz dozownik typu zaworu z pętlą. Do analizy zostanie wykorzystana kolumna analityczna o wymiarach 150 x 4,6 mm. Wypełnienie (RP 18) stanowi żel krzemionkowy z chemicznie związanymi grupami oktadecylowymi, czyli tzw. odwrócona faza; średnica ziaren 5 μm . Fazą ruchomą jest mieszanina acetonitryl/woda w stosunku 90:10 (rozdział izokratyczny).

2.4. Dobieranie warunków analizy

Wykonać analizy HPLC roztworu wzorcowego antracenu o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ stosując następujący przepływ fazy ruchomej: 0,8 ml/min; 0,9 ml/min oraz 1 ml/min. Rozważając wpływ czasu retencji analitu na całkowity czas analizy oraz uzyskany kształt piku analitu wybrać odpowiednią prędkość przepływu fazy ruchomej.

2.5. Wykonanie ekstrakcji próbki gleby i analiza chromatograficzna

Naważyć 1,5 g próbki gleby, przenieść do kolby stożkowej o pojemności 250 ml, dodać 20 ml metanolu i wykonać ekstrakcję poprzez wytrząsanie (6 minut). Następnie ekstrakt przesączyć do kolbki i zatężyć na odparowywaczu obrotowym do objętości 2 ml. Zatężony ekstrakt rozdzielić na dwie równe części przenosząc za pomocą pipety do 2 naczynek zakręczanych o pojemności 1,5 ml (dwie identyczne próbki 1 i 2).

Dokonać analizy chromatograficznej próbki 1 otrzymanej w wyniku ekstrakcji gleby (3 powtórzenia, lub według zaleceń prowadzącego).

Do próbki 2 należy dodać 10 - 15 μl (według zaleceń prowadzącego) roztworu wzorcowego o stężeniu 2 mg/25 ml, wymieszać i dokonać analizy chromatograficznej (3 powtórzenia, lub według zaleceń prowadzącego). Po każdej analizie koniecznie należy umyć kilkakrotnie strzykawkę a także pętlę dozownika metanolem.

2.6. Opracowanie wyników

Należy zmierzyć powierzchnie piku na chromatogramach próbki ekstraktu gleby bez dodatku wzorca i z dodatkiem wzorca. Następnie obliczyć zawartość antracenu w glebie. W opracowaniu należy podać wszystkie wykonane obliczenia oraz załączyć chromatogramy.

3. Zakres wymaganych wiadomości

- podstawowe pojęcia i definicje dotyczące procesu chromatograficznego min. czas i objętość retencji, czas martwy (zerowy), zredukowany czas retencji, współczynnik podziału K , współczynnik retencji (współczynnik pojemności) k , współczynnik selektywności α , zdolność rozdzielcza kolumny R_s , sprawność kolumn chromatograficznych (WRPT, N),

- analiza ilościowa: metoda wzorca wewnętrznego, metoda kalibracji bezwzględnej, metoda normalizacji wewnętrznej,
- wysokosprawna chromatografia cieczowa: schemat blokowy aparatury ze szczególnym uwzględnieniem dozownika typu zaworu z pętlą oraz detektora spektrofotometrycznego UV,
- fazy stacjonarne i ruchome stosowane w chromatografii adsorpcyjnej i podziałowej HPLC a zwłaszcza: żel krzemionkowy i fazy odwrócone, nośniki, fazy związane chemicznie, szereg eluotropowy,
- rozdział w warunkach izokratycznych i w gradiencie.

4. Literatura

1. Stepnowski P., Synak E., Szafranek B., Kaczyński Z. *Monitoring i analityka zanieczyszczeń w środowisku*. Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2010.
2. Szczepaniak W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, W-wa, 1996.
3. Minczewski J., Marczewski Z., *Chemia analityczna, tom III*, PWN, W-wa, 1986.
4. Ewing G.W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, W-wa, 1980.
5. Witkiewicz Z., *Podstawy chromatografii*, WNT, W-wa, 1995, 2005.

5. Odczynniki i sprzęt laboratoryjny

- | | |
|---|---|
| • fazy ruchome: acetonitryl oraz woda dejonizowana | • kolba stożkowa V = 250 ml oraz korek |
| • strzykawka do HPLC | • łyżka metalowa |
| • metanol do mycia strzykawek V = 50 ml | • waga techniczna |
| • roztwory wzorcowe antracenu o stężeniach 2 mg/25 ml oraz 1 µg/ml w metanolu | • metanol V = 250 ml |
| • strzykawka V = 50 µl do roztworów wzorcowych | • cylinder miarowy V = 50 ml |
| • 2 naczynka zakręcane V = 1,5 ml | • kolbka do odparowywacza z konicznym dnem V = 50 ml oraz pasujący reduktor |
| • pipeta miarowa V = 1 ml oraz pompka do pipet | • średni lejek oraz pasujący sącdek |
| | • statyw |
| | • odparowywacz |
| | • gleba zanieczyszczona antracenenem |