

Ćwiczenie nr 1

Ekstrakcja i oznaczanie fenolu metodą SPE (*solid phase extraction*) z detekcją UV-Vis

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z techniką przygotowania próbki do analizy metodą zateżania do ciała stałego SPE oraz ilościowe oznaczenie fenolu metodą krzywej kalibracyjnej przy użyciu analizy UV-Vis.

Wprowadzenie:

1. SPE (*ang. Solid phase extraction*)

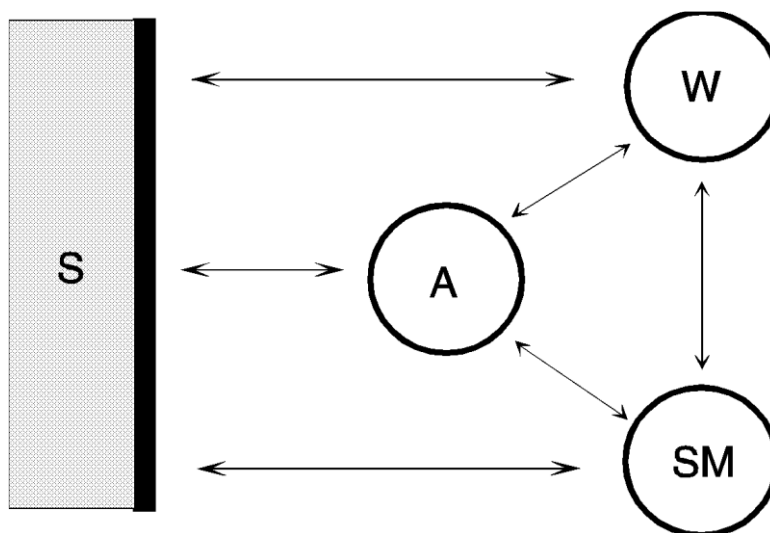
Przygotowanie próbki przed końcowym oznaczaniem stanowi niezwykle istotny etap procedury analitycznej. Ocenia się, że przygotowanie próbki zajmuje co najmniej połowę czasu realizacji całej procedury analitycznej, może być również jednym z głównych źródeł błędów.

Wśród wielu metod wzbogacania analitów dużym zainteresowaniem cieszy się metoda wykorzystująca zjawisko adsorpcji na sorbentach stałych ze względu na szybkość i możliwość automatyzacji analizy, dokładność i odtwarzalność, a przy doborze odpowiedniego sorbentu-selektywność.

Metoda ekstrakcji nielotnych substancji z cieczy, szczególnie z wody, w układzie ciecz - ciało stałe (*ang. Solid Phase Extraction, SPE*) jest wygodną metodą ekstrakcji i wzbogacania analitów. W porównaniu z alternatywną ekstrakcją ciecz-ciecz SPE zużywa znacznie mniej rozpuszczalników, jest mniej czasochłonna i możliwa do przeprowadzenia przy użyciu prostej aparatury.

W ekstrakcji do ciała stałego, wykorzystuje się proces adsorpcji związku (lub grupy związków), a następnie desorpcji oznaczanych związków do ekstrahentu, którym jest odpowiednio dobrany rozpuszczalnik organiczny. Sorpcja z wody jest dynamicznym procesem, który polega na przechodzeniu cząsteczek substancji organicznych z jednej fazy do drugiej. Substancje organiczne rozpuszczone w wodzie są rozdzielone pomiędzy wodę a sorbent zgodnie ze współczynnikiem podziału. W procesie adsorpcji odgrywają rolę dwa mechanizmy: sorpcja na powierzchni złoża i oddziaływanie oznaczanych związków (analitu) z wodą (matrycą). Mechanizm adsorpcji powierzchniowej jest zależny od oddziaływań pomiędzy analitem a aktywnymi centrami na powierzchni sorbentu. Im wyższa jest energia wyzwolana w procesie retencji, tym trudniejsze jest wymywanie (elucja) analitów. Dobranie właściwego sorbentu

polega na znalezieniu kompromisu pomiędzy retencją a elucją. W praktyce wybór sorbentu można oprzeć na zasadzie „podobne sorbuje podobne”. Jednakże w procesie SPE występują nie tylko oddziaływania pomiędzy analitem a sorbentem. Wzajemne oddziaływania zachodzą również pomiędzy pozostałymi składnikami matrycy, wodą i sorbentem. Rysunek 1 przedstawia system wzajemnych oddziaływań zachodzących w procesie SPE.



Rysunek 1. Schemat oddziaływań w układzie ciało stałe – matryca próbki wodnej
S – sorbent, A - analit, W - woda, SM - składnik matrycy

Wysoką wydajność sorpcji można osiągnąć w przypadku występowania silnych oddziaływań w układzie analit – sorbent, przy równocześnie słabych oddziaływaniach w układach analit – woda i sorbent – woda. Wydajność sorpcji można zwiększyć poprzez zmniejszenie oddziaływań analit – woda, stosując np. efekt wysalania, co w praktyce wiąże się z dodaniem obojętnych elektrolitów (NaCl, KCl). Wysokie stężenie składników matrycy (konkurujących z analitem w procesie sorpcji) może być przyczyną przekroczenia pojemności złoża. W takim przypadku należy użyć więcej złoża lub zastosować złoże selektywne, na którym zostaną zaadsorbowane tylko substancje oznaczane.

Charakterystycznym parametrem w SPE jest pojemność złoża, związana ze zdolnością sorbowania składników próbki. Pojemność złoża to maksymalna, możliwa w danych warunkach ilość substancji, jaka może ulec sorpcji na stałym sorbencie. Pojemność złoża zależy od ilości aktywnych centrów na powierzchni, a więc od typu sorbentu oraz od właściwości sorbowanych substancji, tj. od charakteru chemicznego i wielkości cząsteczki. Równanie 1 przedstawia wzór, pozwalający wyznaczyć pojemność sorbentu.

$$q = \frac{(C_0 - C_e) \cdot V}{M} \quad (1)$$

- q - pojemność sorpcyjna złoza [mg/g],
- C_0 - stężenie początkowe składnika próbki [mg/l],
- C_e - stężenie równowagowe [mg/l],
- V - objętość próbki [l],
- M - masa złoza [g].

Orientacyjnie przyjmuje się, że pojemność sorpcyjna złoza wynosi od 1 do 5 % masy sorbentu, w zależności od mechanizmu procesu ekstrakcji. Na ogół stężenia substancji występujących w próbkach środowiskowych są na poziomie od ng/l do μ g/l. Zakładając stały przepływ przez kolumnę SPE rozpuszczalnika o stałym stężeniu zawartych w nim oznaczanych substancji można, podobnie jak w procesie chromatograficznym, wyznaczyć krzywe elucji. Pozwala to na określenie objętości przebiecia kolumny. Powierzchnia adsorbentu wysyca się cząsteczkami zatężanej substancji aż na złożu nie może zatrzymać się już więcej badanej substancji. Po przebieciu kolumny dalsze przepuszczanie roztworu powoduje wzrost stężenia analitu w wycieku aż do osiągnięcia stężenia substancji w wyjściowym roztworze.

Przyjmuje się, że minimalna sprawność złoza kolumny do SPE wynosi około 11 pólk teoretycznych. Proces ekstrakcji zależy od wartości, związanej z właściwościami sorpcyjnymi złoza kolumnienki oraz czynnikami geometrycznymi, tj. rozmiarami, kształtem i wielkością ziaren sorbentu. Dla danego układu sorpcyjnego objętość przebiecia można regulować zmieniając rozmiary złoza kolumnienki. Jednak wzrost masy złoza nie zawsze jest zjawiskiem korzystnym.

Bardzo ważnym parametrem w technice SPE jest współczynnik wzbogacenia (zatężenia). Można go wyrazić za pomocą równania (5):

$$F = \frac{V_p}{V_d} \cdot R \quad (5)$$

F - współczynnik zatężenia,

V_p - objętość próbki przepuszczonej przez kolumnę,

V_d - objętość rozpuszczalnika użytego do desorpcji,

R - odzysk, $R = m_w/m_0$ (m_w - ilość substancji wyekstrahowanej, m_0 - ilość substancji przepuszczonej przez kolumnę)

Odzysk można określić jako stosunek ilości substancji wyekstrahowanej do ilości przepuszczonej przez kolumnę. Nie zawsze dana kolumnienka pozwala na pełne odzyskiwanie R zaadsorbowanych substancji, ale też w metodzie SPE nie jest to problem najważniejszy. Ważne, aby wyznaczyć R , im bliższy jest 1, tym oczywiście korzystniej.

Istota wzbogacania w procesie SPE polega na przeprowadzeniu związków z dużej objętości matrycy (wody) do znacznie mniejszej objętości eluatu (rozpuszczalnika organicznego),

Praca z kolumnką SPE składa się z kilku etapów, są to: wybór odpowiedniej kolumny do SPE, kondycjonowanie kolumny, naniesienie próbki, przemywanie, eluowanie analizowanej substancji.

Wybór kolumny do SPE

Dobór kolumny zależy od rodzaju analizowanej substancji, objętości próbki, stopnia zanieczyszczenia próbki i jej wielkości. Pojemność kolumny zależy od objętości próbki. Dla próbek o objętości mniejszej od 1ml używamy kolumny o pojemności 1ml. Kolumny 3ml i 6ml używamy do próbek o objętości od 1 do 250 ml.

Kondycjonowanie złoża

Kondycjonowanie uaktywnia fazę stałą przed procesem ekstrakcji. Użyty do tego celu rozpuszczalnik zależy od typu kolumny i jej przeznaczenia. Aby zapobiec wysychaniu fazy między etapem kondycjonowania i ekstrakcji należy w kolumnie pozostawić około 1mm rozpuszczalnika powyżej górnego filtra.

Dozowanie próbki

Dozowanie próbki powinno odbywać się z tak dobraną prędkością przepływu, aby zapewnić odpowiedni czas kontaktu próbki z sorbentem. Objętość próbki natomiast powinna być tak dobrana, aby nie nastąpiło przebicie złoża. Próbka powinna być przepuszczana przez fazę stałą z małą szybkością nie przekraczającą 5ml/min. Jeśli czas ekstrakcji nie jest ograniczony innymi względami (np. hydrolizą próbki) najlepsza ekstrakcja zachodzi wtedy, gdy przez kolumnę utrzymany jest przepływ kroplowy.

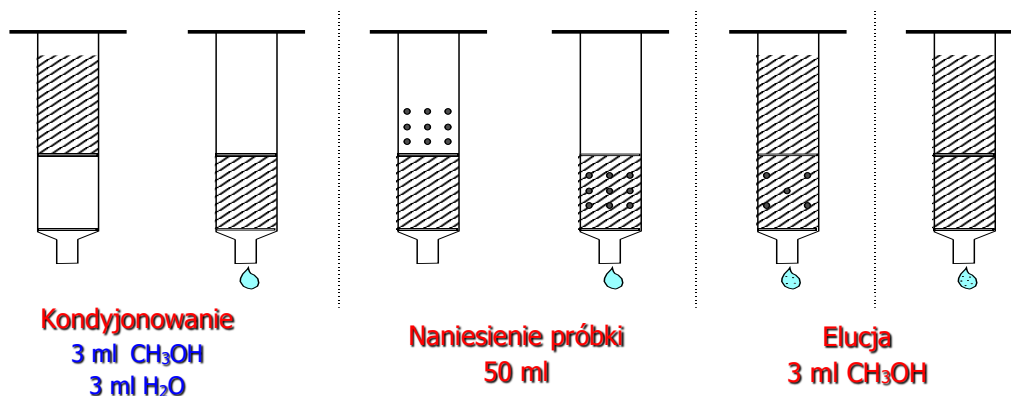
Usuwanie zanieczyszczeń i wody

Proces przemywania stosujemy, jeśli chcemy usunąć z próbki pozostałości zanieczyszczeń. Objętość rozpuszczalnika nie może przekroczyć pojemności kolumny. Użyty rozpuszczalnik powinien łatwiej rozpuszczać zanieczyszczenia niż analizowaną substancję. Bardzo często na etapie przemywania stosuje się rozpuszczalniki o odpowiednio dobranej wartości pH lub mieszaniny rozpuszczalników. Następnie złoże należy dobrze osuszyć, aby ułatwić proces desorpcji. Woda może być usuwana np. pod ciśnieniem strumieniem powietrza, strumieniem azotu, poprzez odwirowanie lub przechowywanie kolumny w eksykatorze

Wymywanie (elucja)

Proces desorpcji polega na wymywaniu zaadsorbowanych substancji ze złoża odpowiednio

dobranym rozpuszczalnikiem, ewentualnym jego wzbogaceniu a następnie dalszej analizie np. UV-Vis czy chromatograficznej. Dobór odpowiedniego eluentu jest bardzo istotny. Siła adsorpcji cząsteczek eluentu powinna znacznie przewyższać oddziaływania występujące między substancją oznaczaną i powierzchnią adsorbentu. Rozpuszczalnik powinien być użyty co najmniej w dwóch porcjach. Najlepszy efekt wymywania uzyskiwany jest wtedy, gdy każda porcja rozpuszczalnika pozostaje w kontakcie z fazą stacjonarną od 20 sekund do 1 minuty. Na rysunku 2 przedstawiono zasadę ekstrakcji do ciała stałego.



Rysunek 2 Zasada ekstrakcji w SPE

Sorbenty stosowane w SPE:

Stosowane w SPE fazy stałe można podzielić ze względu na typ oddziaływań:

- fazy normalne – wykorzystujące oddziaływania polarne, w których polarna faza stacjonarna zatrzymuje polarne związki, a słabo oddziałuje na związki niepolarne,
- fazy odwrócone – wykorzystujące oddziaływania hydrofobowe, w których niepolarna faza stacjonarna zatrzymuje niepolarne związki,
- wymianę jonową – wykorzystujące oddziaływania między jonami; powierzchnia adsorbentu jest modyfikowana grupami funkcyjnymi, które mogą ulegać jonizacji; na kolumnie zatrzymywany jest analit zawierający jony o przeciwnym znaku niż jony fazy stacjonarnej.

Do wzbogacania zanieczyszczeń z wody stosuje się głównie następujące typy sorbentów :

- sorbenty węglowe,
- sorbenty polimeryczne,
- jonity,
- sorbenty zawierające metale,
- fazy chemicznie związane.

Najczęściej używane są krzemionki modyfikowane grupami alkilowymi i aryłowymi. Istotnymi cechami chemicznie modyfikowanych żeli krzemionkowych jest ich duża pojemność sorpcyjna, duża szybkość ustalania się równowagi sorpcyjnej, wytrzymałość mechaniczna, łatwość desorpcji wielu związków małymi objętościami rozpuszczalników. Chemicznie związane fazy organiczne zmieniają polarność krzemionki. Dzięki temu fazy chemicznie związane mogą być używane do zateżania zarówno związków polarnych jak i niepolarnych. Do najczęściej używanych faz niepolarnych (hydrofobowych) należą fazy oktyłowa i oktadecylowa.

Ekstrakcja ciecz-ciało stałe jest bardziej skuteczną metodą przygotowania próbek niż tradycyjna ekstrakcja ciecz-ciecz dzięki następującym zaletom:

- skrócenie czasu analizy,
- ominięcie dodatkowych etapów (wirowania, filtracji lub destylacji),
- jest wygodna w wykonaniu, nie wymaga kłopotliwych rozdzielaczy,
- jest bardziej przyjazna środowisku naturalnemu dzięki mniejszemu zużyciu rozpuszczalników,
- umożliwia równoczesną obróbkę większej liczby próbek,
- daje odtwarzalne wyniki,
- w SPE nie tworzy się emulsja powstająca przy ekstrakcji ciecz-ciecz,
- daje wyższe odzyski,
- SPE jest szeroko stosowana w przygotowaniu próbek do analizy metodami HPLC, TLC, GC, spektrofotometrii UV/VIS i IR oraz technikami immunologicznymi,
- SPE upraszcza procedury stosowane we współczesnym laboratorium,
- daje możliwość doboru odpowiedniej fazy wiążącej, pozwala na wysoką selektywność oraz wysoką odtwarzalność wyników,
- stosując podciśnieniowy system obróbki próbek można przygotować równocześnie od 1 do 24 próbek,
- jest prosta do automatyzacji.

Ekstrakcja SPE może być stosowana nie tylko do oczyszczania i zateżania próbek wody, ale też do ich pobierania. Substancje po zaadsorbowaniu w kolumnie, w miejscu pobrania próbki, są transportowane do laboratorium łatwiej niż badana woda, w której te substancje się znajdowały. Próbka w kolumnie może być przechowywana przez długi czas, nawet kilka miesięcy, bez znaczącego wpływu na wyniki analizy. Zachodzi to również, gdy ilość zaadsorbowanej substancji jest zbliżona do granicy wykrywalności.

2. Fenole w próbkach wodnych

Badania składu i właściwości wód powierzchniowych, podziemnych czy wody do picia obejmują oznaczanie fenoli. Pod nazwą fenole rozumie się umownie mieszaninę hydroksylo pochodnych benzenu, które można oznaczać podobnymi metodami jak fenol [2]. Zawartość innych związków fenolowych, poza fenolem, reagujących podobnie do niego podaje się jako fenol. Wartość ta bywa nazywana indeksem fenolowym wody.

Fenole dostają się do wód powierzchniowych ze ścieków. W ściekach miejskich zawartość fenoli jest na ogół niewielka, natomiast duże ilości występują w różnych ściekach przemysłowych, szczególnie z koksowni, gazowni, fabryk mas plastycznych, włókien syntetycznych, zakładów farmaceutycznych,

Znaczenie związków fenolowych nie jest jednakowe, największe trudności przy uzdatnianiu wody stwarza fenol i krezol. Obecność w wodzie niewielkich ilości fenolu, np. rzędu 0.005 mg/dm^3 , może spowodować podczas chlorowania wody powstanie chlorofenoli, głównie o-chlorofenolu, p-chlorofenolu, 2,4-dichlorofenolu i 2,6-dichlorofenolu, które powodują odrażający zapach i smak wody. Czyni to wodę niezdatną do zasilania wodociągów. Usuwanie zapachu i smaku chlorofenoli stanowi wielki problem w procesie uzdatniania wody. Z tych głównie względów woda ujmowana do picia i celów gospodarczych nie powinna zawierać fenoli w ilościach ponad 0.005 mg/dm^3 .

Fenole ulegają biologicznemu rozkładowi w wodzie, jednak proces ten zależy od szeregu czynników, między innymi od pory roku i w okresie zimowym jest prawie całkowicie zahamowany. Fenole mogą również powodować straty ekonomiczne (kumulować się w mięsie ryb, nadając im nieprzyjemny smak).

Odczynniki:

- Wodny roztwór fenolu 20 [mg/l]– roztwór podstawowy;
- Woda dejonizowana;
- Metanol – rozpuszczalnik;
- Nitroprusydek sodu o stężeniu $c=0,01 \text{ [mol/l]}$;
- Chlorowodorek hydroksyminy o stężeniu $c=0,04 \text{ mol/l}$
- Bufor fosforanowy o $\text{pH}=11,8$
- Kolumnienki do SPE C18 o objętości złoża 500 mg

Aparatura:

- Systemu do ekstrakcji SPE;
- Spektrofotometr UV-Vis;

Wykonanie ćwiczenia:

Stosowana metoda oznaczania śladowych ilości fenolu w wodzie opiera się na ekstrakcji analitu metodą SPE [3,4], a następnie spektrofotometrycznym oznaczeniu wyekstrahowanych związków fenolowych w oparciu o barwny produkt reakcji analitu z nitroprusydkiem sodu oraz chlorowodorkiem hydroksyloaminy w środowisku buforowym o pH 10.6 –11.8 [5].

1. PRZYGOTOWANIE ROZTWORÓW WZORCOWYCH FENOLU-KRZYWA KALIBRACYNA

Do 6 kolbek miarowych o poj. 50 ml przenieść kolejno: 0,0ml, 0,5ml, 1,0ml, 2,5ml, 5,0ml, 7,5ml roztworu podstawowego fenolu o stężeniu $c=20$ mg/L, 1ml nitroprusydku sodu o stężeniu $c=0,01$ mol/l, 1 ml chlorowodorku hydroksyloaminy o stężeniu $c=0,04$ mol/l i 3 ml buforu fosforowego o pH=11,8 i dopełnić wodą destylowaną do kresek. Wymieszać, odczekać 15 min. i zmierzyć absorbancje roztworów w 1 cm kuwetach przy $\lambda=700$ nm.

Stężenia otrzymanych roztworów **wynoszą** odpowiednio: 0,0; 0,2; 0,4; 1,0; 2,0 i 3,0 mg/l,

2. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO EKSTRACJI SPE

2.1. Otrzymane kolbki z roztworem do analizy (o nieznanym stężeniu fenolu) uzupełnić wodą dejonizowaną do objętości 50ml

2.2. Do trzech 50ml kolbek dodać kolejno: 1ml, 2,5ml i 5 ml roboczego roztworu fenolu o $c=20$ mg/l i uzupełnić kolbki wodą dejonizowaną.

3. EKSTRACJA DO FAZY STAŁEJ - SPE

Wykonanie zateżenia próbek techniką SPE z wykorzystaniem systemu do ekstrakcji SPE i kolumniek typu SPE-500, C18 o objętości złoża 500 mg, modyfikowana krzemionka fazą oktadecylową (Rysunek 5)

3. Ekstrakcja do fazy stałej.

Do ekstrakcji próbek otrzymanych do analizy i próbek z dodatkiem wzorca zastosować kolumny C18 o objętości 3ml. Zawartość adsorbentu - oktadecylu osadzonego na żelu krzemionkowym – wynosi 500 mg.

1. Kondycjonowanie kolumny o objętości złoża 500mg:

- Dwukrotnie po 3 ml MeOH (Metanol specjalnej czystości)
- Dwukrotnie po 3 ml wodą specjalnej czystości (woda z Millipora)

Uwaga: Na tym etapie nie dopuścić do wysuszenia złoża.

2. Przepuścić przez złożę badane próbki z prędkością nie większą niż 5 ml/min.
 3. Przepłukać kolumnkę ok. 3 ml czystej wody
 4. Osuszyć kolumnkę powietrzem (pod ciśnieniem ok.10-15 min), wodę po przejściu przez kolumnkę usunąć z urządzenia systemu SPE, wstawić naczynka szklane, przeznaczone do zbierania eluatu)
 5. Wymyć analit z kolumnki 2x1 ml metanolu
 6. Oznaczenie spektrofotometryczne fenolu.
- Ilościowo przenieść ekstrakty do kolb na 50 ml. Kolejno dodać do kolb 1ml nitroprusydku sodu o $c=0,01$ mol/l, 1 ml chlorowodoru hydroksyaminy o $c=0,04$ mol/l i 3 ml buforu fosforanowego o $pH=11,8$ i dopełnić wodą destylowaną do kreski. Wymieszać, odczekać 15 min. i zmierzyć absorbancje roztworów w 1 cm kuwetach przy $\lambda=700$ nm.

Opracowanie wyników:

- 1) Wykreślić krzywą kalibracyjną $A = f(c)$ dla roztworów wzorcowych fenolu.
- 2) Z wyznaczonej krzywej kalibracyjnej odczytać stężenia fenolu w analizowanych próbkach (mg/l).
- 3) Znając rzeczywiste stężenie fenolu w próbce, obliczyć wydajność procesu ekstrakcji, $R\% = \frac{C_x}{C_{wz}} \cdot 100\%$, gdzie $R\%$ - odzysk [%], C_x - oznaczone stężenie analitu w badanej próbce, C_{wz} - rzeczywiste stężenie analitu w badanej próbce.

LITERATURA

1. Z. Witkiewicz, Podstawy chromatografii, WNT, Warszawa, 2000
2. W. Hermanowicz, J. Dojlido, W. Dożańska, B. Koziorowski, J. Zerbe, Fizyczno-chemiczne badanie wody i ścieków, Wyd. Arkady, Warszawa, 1999
3. SPE application, MACHEREY-NAGEL GmgH & Co, Niemcy
4. Spe application, J.T.Baker, Holandia
5. K. Chunli, W. Ying, L. Runbo, D. Yaoguo, L. Jun, Z. Bowen, Z. Liming, D. Yuzhong, A modified spectrophotometric method for the determination of trace amounts of phenol in water, Microchemical Journal 64 (2000) 161-171
6. ntp.ch.uj.edu.pl/chemometria/pliki/instrukcja.doc

