

## Ćwiczenie nr 2

### Ekstrakcja WWA z roztworów wodnych techniką SBSE (stir bar sorptive-extraction)

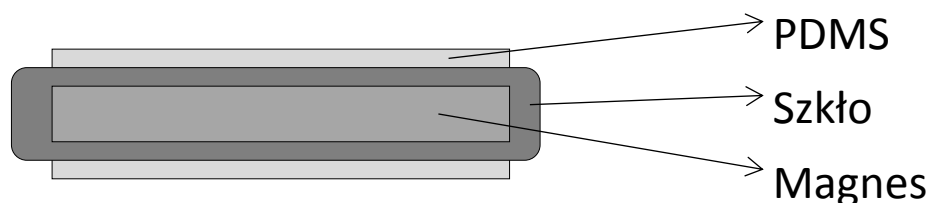
Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z techniką SBSE przygotowania próbki do analizy oraz ilościowe oznaczenie wybranych WWA z zastosowaniem detekcji GC/MS

#### **Wprowadzenie:**

##### **1. SBSE (*ang. stir bar sorptive-extraction*)**

Jedną z bardziej dynamicznie rozwijających się w ostatnim dziesięcioleciu metod ekstrakcji jest technika ekstrakcji sorpcyjnej, wykorzystująca mieszadło magnetyczne pokryte warstwą medium ekstrakcyjnego (z *ang. Stir Bar Sorptive Extraction – SBSE*). Technika ta została po raz pierwszy wprowadzona przez Baltussena i współpracowników w 1999 roku [1] do oznaczania śladowych ilości mikrozanieczyszczeń organicznych w roztworach wodnych.

Przygotowanie próbek ciekłych do analizy przy użyciu ruchomego elementu sorpcyjnego składa się z dwóch etapów: ekstrakcji i desorpcji. W pierwszym etapie anality sorbują się w warstwie substancji osadzonej na pręcie (elementie) sorpcyjnym zanurzoną w próbce. Na Rys. 1 przedstawiono schematycznie rozwiązanie konstrukcyjne takiego mieszadła.



Rys. 1. Schemat mieszadła stosowanego w technice SBSE

Metalowy pręt sorpcyjny o długość 10-40 mm i średnicy około 1 mm, pokrywa się cienką warstwą szkła. Osadza się na nim warstwę sorbentu. Jako czynnik ekstrakcyjny najczęściej jest wykorzystywany polidimetylosiloksan (PDMS), o grubości od 0,3 do 1 mm, co odpowiada objętości PDMS od 55÷220  $\mu\text{L}$  [1]. Mieszadło to w handlu dostępne jest pod nazwą Twister<sup>TM</sup> (Gerstel, Mülheim, Niemcy).

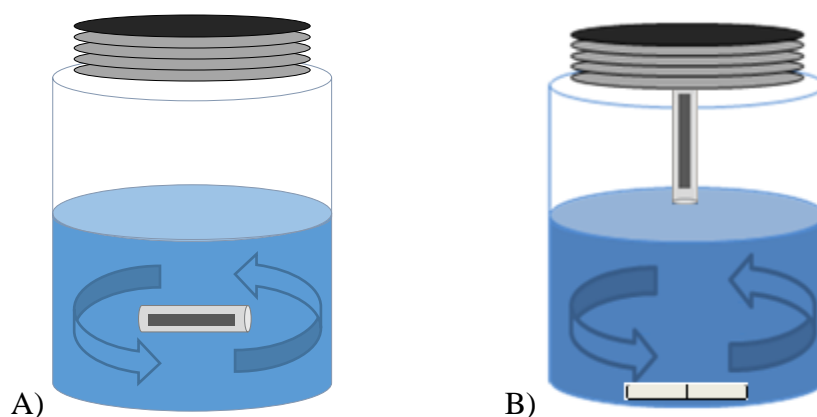
Istota takiej ekstrakcji polega na ekspozycji mieszadła w próbce o objętości od kilkunastu do kilkudziesięciu mililitrów oraz intensywnym mieszaniu przez określony czas

(30÷240 min). Czas mieszania, czyli czas ekstrakcji, zależy od objętości próbki, prędkości mieszania i wymiarów mieszadełka. Czas ten musi być optymalizowany dla każdego zadania analitycznego oddzielnie. Czas ekstrakcji optymalizuje się przez pomiar odzysku analitu w funkcji czasu. Za optymalny czas mieszania uznaje się czas, poza którym dalsze mieszanie nie prowadzi do zwiększenia odzysku. Porównując technikę SBSE z SPME, z której się ona wywodzi, należy stwierdzić, że ze względu na znacznie większą ilość PDMS na sorpcyjnym pręcie mieszającym (55÷220  $\mu\text{L}$ ) w stosunku do włókna sorpcyjnego, (0.6  $\mu\text{L}$ ) wydajność ekstrakcji jest większa.

Drugim etapem przygotowania próbek do analizy techniką SBSE jest desorpcja analitu. Może ona być realizowana w dwojaki sposób:

- desorpcja termiczna (z ang. *Thermal Desorption* –TD),
- desorpcja rozpuszczalnikiem (z ang. *Liquid Desorption* – LD).

Uwolnienie zaadsorbowanych związków organicznych z warstwy ekstrakcyjnej jest realizowane głównie przez desorpcję termiczną z użyciem automatycznych desorberów, zintegrowanych z układem chromatograficznym. W przypadku analizy niektórych próbek, głównie pochodzenia biologicznego, zaleca się delikatne spłukanie pręta mieszającego wodą destylowaną w celu usunięcia zaadsorbowanych cukrów, protein i innych składników próbki przeszkadzających analizie. Niektóre z tych składników są nielotne w warunkach desorpcji termicznej i niesplukane mogą pozostać na pręcie zakłócając kolejną ekstrakcję. Desorpcja z pręta sorpcyjnego zawierającego dużą ilość PDMS może trwać dość długo, przez co może utrudniać rozdzielanie składników analizowanej mieszaniny oraz powodować rozmycie pików. Dlatego w trakcie desorpcji stosuje się wymrażanie desorbowanych substancji w pułapce, np. w temp.  $-40^{\circ}\text{C}$ , a po jej zakończeniu szybko ogrzewa się pułapkę z zamrożonymi analitami, które w postaci wąskiego pasma pierwotnego wprowadza się do kolumny [2]. SBSE może być stosowana do ekstrakcji analitów bezpośrednio z roztworu, jak również z fazy nadpowierzchniowej analizowanych materiałów, np. z substancji lotnych obecnych w kawie czy napojach chłodzących. W takim przypadku pręt sorpcyjny utrzymuje się przez pewien czas nad powierzchnią analizowanej substancji, a nie zanurza się go w próbce. Na Rys. 2 przedstawiono schematycznie układ stosowany w technice SBSE: a) z roztworu i b) z fazy nadpowierzchniowej.



Rys. 2. Układ stosowany stosując technikę SBSE: a) z roztworu i b) z fazy nadpowierzchniowej

Procedury oznaczania związków organicznych po ekstrakcji sorpcyjnej wykorzystującej mieszadło magnetyczne pokryte warstwą medium ekstrakcyjnego zdominowane są przez chromatografię gazową sprzężoną z detektorem masowym (GC/MS) [3-8].

Śledząc literaturę dotyczącą zastosowania techniki SBSE można stwierdzić, że znajduje ona coraz szersze zastosowanie w oznaczaniu śladowych ilości mikrozanieczyszczeń organicznych w roztworach wodnych.

Jednym z pierwszych zastosowań techniki SBSE [9] było wykorzystanie elementu sorpcyjnego typu Twister™ w procesie wzbogacania pestycydów z różnych matryc. Szczególną uwagę zwrócono na warzywa, owoce i odżywki dla niemowląt, ponieważ w tym przypadku etap izolacji i wzbogacania analitów jest znacznie trudniejszy do przeprowadzenia niż w przypadku próbek wodnych. Pozostałości pestycydów w badanych próbkach oznaczono z wykorzystaniem techniki kapilarnej chromatografii gazowej z ustalonym czasem retencji, sprzężonej ze spektrometrią mas (z ang. *Retention Time Locked Capillary Gas Chromatography – Mass spektrometry* - RTL-CGC-MSang). Stosując technikę SBSE – RTL – CGC -MSang można wykryć powyżej 300 pestycydów w próbkach warzyw, owoców i odżywek dla niemowląt oraz 400 pestycydów w próbkach wody i napojów.

Technika SBSE znajduje zastosowanie w analizie:

- próbek środowiskowych,
- próbek biomedycznych,
- próbek żywności.

Technika ta znalazła także zastosowanie do wzbogacania śladowych ilości lotnych związków organicznych, związków chloroorganicznych, wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), polichlorowanych bifenyli (PCBs), pestycydów, hormonów, alkilofenoli i bisfenolu A [10-14].

Jak wynika z tego krótkiego przeglądu literatury technika SBSE została zaakceptowana przez analityków, ilość prac wzrasta z roku na rok i ma tendencję rozwojową. Potwierdza to fakt, że dostępne są komercyjne mieszadła pokryte warstwą sorpcyjną.

Warunki ekstrakcji określa się przez dobór:

- odpowiedniego czasu,
- intensywności mieszania,
- odpowiedniej temperatury,
- odpowiedniego pH roztworu próbki,
- ilości dodawanej soli obojętnej do próbki,
- modyfikatora organicznego i jego ilości,
- objętości próbki i objętości fazy ekstrahującej.

Wydajność ekstrakcji jest tym wyższa im mniejszy jest stosunek faz wodnej do ekstrahującej, czyli im większa objętość fazy ekstrahującej. Przy standardowej objętości badanych próbek, wynoszącej 10 mL, stosunek faz w przypadku SBSE wynosi 400 (10 mL :24  $\mu$ L), zaś w przypadku stosowania techniki SPME, gdzie objętość fazy na włóknie wynosi 5  $\mu$ L – stosunek faz wynosi 20000 (10 mL:5  $\mu$ L). Jest to bezpośrednią przyczyną znacznie wyższego odzysku w SBSE w porównaniu do SPME.

## **2. WWA - Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne**

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne to obszerna grupa związków chemicznych, zawierających od dwóch do kilkunastu podstawionych lub niepodstawionych, skondensowanych pierścieni aromatycznych. Dotychczas poznano około stu związków homocyklicznych występujących naturalnie w środowisku, których skład chemiczny opiera się na atomach węgla i wodoru. Jednak znanych jest również kilkaset pochodnych alkilowych, nitrowych czy aminowych, a także heterocykliczne związki z wbudowanymi atomami tlenu, siarki lub azotu. Istnieje podział WWA ze względu na ilość pierścieni aromatycznych w cząsteczce i tak związki zbudowane z pięciu i więcej pierścieni aromatycznych nazywane są „ciężkimi”, natomiast te złożone z mniejszej ilości określane są jako „lekkie”.

WWA stanowią stały organiczny element zanieczyszczeń środowiska. Z punktu widzenia chemicznego powstają one podczas niepełnego spalania substancji organicznych. Źródłami naturalnymi są przede wszystkim erupcje wulkanów, pożary lasów i łąk, a także synteza przez glony morskie. Śladowe ilości węglowodorów znajdują się w kopalinach oraz powstają w procesie naturalnego powstawania ropy naftowej czy węgla. Należy więc zauważyć, że WWA od zawsze były obecne w środowisku naturalnym, jednak ich stężenia były na tyle niskie, że

nie wywierały zauważalnego negatywnego efektu. Na ich znaczny wzrost wpłynęły źródła antropogeniczne, na które składają się czynniki związane z każdą formą bezpośredniego lub pośredniego wpływu człowieka na otoczenie. I tak dominującą rolę odgrywają produkty niepełnego spalania paliw kopalnych i drewna, szczególnie w starszych i nieprawidłowo regulowanych piecach węglowych, oraz produkty spalania paliw i utylizacji śmieci. W mniejszym stopniu WWA przedostają się do środowiska w wyniku emisji gazów i pyłów z zakładów przemysłowych (rafinerie, koksownie, huty aluminium, żelaza i miedzi) oraz podczas przeprowadzania procesów, mających na celu wytworzenie energii w elektrowniach i elektrociepłowniach. Należy jednak pamiętać, że przede wszystkim skład i ilość mieszanin WWA przedostających się do środowiska zależy od rodzaju substancji spalanej, metody spalania oraz stosowania filtrów i innych urządzeń chroniących przed ich emisją.

Szybki rozwój cywilizacyjny spowodował nagły wzrost ich stężenia, w związku z czym zaczęły one wywoływać negatywny efekt na środowisko oraz wszelkie formy życia. WWA przedostają się do środowiska oraz produktów żywnościowych, a tym samym do organizmów ludzkich, przeważnie w postaci mieszanin. Za wyznacznik ich obecności uznaje się oznaczenie benzo[a]pirenu, który do tej pory jest najlepiej poznanym węglowodorem z całej grupy. Zgodnie z Rozporządzeniem Rady Ministrów z dnia 13 września 2012r. docelowym poziomem benzo[a]pirenu w powietrzu ze względu na ochronę zdrowia ludzi jest stężenie  $1\text{ng}/\text{m}^3$  [2]. Niestety, poziom ten jest w większości przypadków znacznie przekraczany. Istnieje wiele możliwości rozpowszechniania się WWA w środowisku, jednak jedną z najprostszych i najpowszechniejszych są pyły drogowe, które stanowią idealny nośnik dla tych szkodliwych węglowodorów.

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 zateżania oraz technik oznaczania charakteryzujących się dużą czułością.

### **Odczynniki:**

- Roztwór wybranych WWA (fluoren, antracen, piren) w heksanie o stężeniu  $c = 100$  [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] – roztwór podstawowy;
- Dichlorometan;

- Woda dejonizowana;

### **Aparatura:**

- Chromatograf gazowy z detektorem mas (GC/MS);  
Analizy wykonać na chromatografie gazowym Thermo Scientific Focus wyposażonym w detektor mas (MS) oraz kolumnę kapilarną TG-SQC GC (15m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m). Pomiar wykonywano z programowaną temperaturą: 3min w 60°C, grzanie 15°C/min do 280°C i utrzymywanie w tej temperaturze przez 10min. Temperatura dozownika 250°C, temperatura detektora: 280°C. Przepływ gazu nośnego, którym był hel, równy był 1ml/min. Wykonano pełne skany widm mas od 50 do 500m/z.
- Mieszadélko TwisterTM- 0,5 mm PDMS (Gerstel, Múrlheim, Niemcy).

### **Wykonanie ćwiczénia:**

#### 1. PRZYGOTOWANIE ROZTWORÓW WZORCOWYCH WWA - KRZYWA KALIBRACYNA

Roztwory wzorcowe oznaczanych WWA o stężeniach: 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 oraz 10,0  $\mu$ g/mL przygotować przez rozcieńczenie roztworu podstawowego o stężeniu 100  $\mu$ g/mL. Roztwory te sporządzić w fiolkach chromatograficznych o objętości 3mL. Pomiar sygnału analitycznego dla roztworów wzorcowych przeprowadzić przed wykonaniem pomiarów dla próbek uzyskanych w wyniku ekstrakcji.

#### 2. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO EKSTRACJI SBSE

- 2.1. Otrzymane kolbki z roztworem do analizy (o nieznanym stężeniu WWA) uzupełnić wodą dejonizowaną do objętości 25ml.
- 2.2. Do kolbki o objętości 25ml dodać 0,125ml roboczego roztworu mieszaniny WWA o stężeniu  $c=1000 \mu$ g/mL i uzupełnić wodą dejonizowaną.

#### 3. EKSTRACJA NA FAZIE STAŁEJ - SBSE

- adsorpcja: do przygotowanych do ekstrakcji próbek wody włożyć sorpcyjne mieszadélko magnetyczne. Próbki mieszać przez 30 min w temperaturze pokojowej;
- desorpcja: sorpcyjne mieszadélko magnetyczne przełożyć (po przemyciu wodą dejonizowaną) do szklanej fiolki o objętości 3 mL, dodać 1 mL Dichlorometanu i desorbować anality mieszając, przez 15 min. Po tym czasie wyjąć mieszadélko z fiolki;
- analiza GC-MS: wykonać analizę chromatograficzną otrzymanego ekstraktu nastrzykując na kolumnę 1 $\mu$ l roztworu..

### **Opracowanie wyników:**

- 1) Wykreślić krzywą kalibracyjną  $A = f(c)$  dla roztworów wzorcowych WWA.
- 2) Z wyznaczonej krzywej kalibracyjnej odczytać stężenia oznaczonych WWA w analizowanych próbkach ( $\mu\text{g/mL}$ ).
- 3) Znając rzeczywiste stężenie WWA 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.

- [1] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, *Journal Microcolumn Separations*, 11 (1999) 737-747.
- [2] Z. Witkiewicz, J. Kałużna-Czaplińska, *Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych*, W.N.T., Warszawa 2011.
- [3] M. Kawaguchi, Y. Ishii, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, *Anal. Chim. Acta* 533 (2005) 57-65.
- [4] S. Nakamura, N. Nakamura, S. Ito, *Journal of Separation Sci.* 24 (2001) 674-677.
- [5] B. Kolahger, A. Hoffman, A.C. Heiden, *Journal of Chromatogr. A* 963 (2002) 225-230.
- [6] P. Popp, P. Keila, L. Montero, M. Rückert, *Journal of Chromatogr. A* 1071 (2005) 155-162.
- [7] S. Nakamura, S. Daishima, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382 (2005) 99-107.
- [8] M. Kawaguchi, Y. Ishii, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, K. Inoue, K. Saito, H. Nakazawa, *Journal of Chromatogr. A* 1049 (2004) 1-8.
- [9] P. Sandra, B. Tienpot, F. David, „Nowe horyzonty w analityce i monitoringu środowiskowym”, Rozdz. 11, Wyd. CEEAM., Gdańsk 2003.
- [10] W. Buchberger, P. Zaborsky, *Acta Chim. Slov.*, 54 (2007) 1-13.
- [11] F. David, P. Sandra, *Journal of Chromatogr. A* 11152 (2007) 54-69.
- [12] F. Sánchez-Rojas, C. Bosch-Ojeda, J. M. Cano-Pavón, *Chromatographia Supplement* 69 (2009) S79-S94.
- [13] K. Ridgway, S.P.D. Lalljie, R.M. Smith, *Journal of Chromatogr. A* 11153 (2007) 36-53.
- [14] H. Kataoka, *Anal. Bioanal Chem.* 396 (2004) 339-364.