

Paulina NOWAK, Marian KAMIŃSKI*

Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej

*Autor do korespondencji, e-mail: markamin@pg.gda.pl

Alternatywne metodyki wydzielenia, identyfikacji oraz oznaczania siarki elementarnej w glebie z wykorzystaniem ekstrakcji do nisko polarnej cieczy, chromatografii cieczowej i spektrofotometrii

Streszczenie: W niniejszej pracy - na podstawie przeglądu literatury oraz badań - opracowano nowe metodyki wydzielenia, rozdzielania od składników towarzyszących, identyfikacji oraz oznaczania siarki elementarnej w glebach, szczególnie zanieczyszczonych nisko lotnymi produktami pochodzącymi z ropy naftowej. Zastosowano ekstrakcję siarki, nisko oraz średnio polarnych składników gleby do niepolarnego n-heksanu. Rozdzielano składniki ekstraktów techniką kolumnowej elucyjnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej w normalnych układach faz (NP-HPLC) z detekcją spektrofotometryczną w zakresie nadfioletu i światła widzialnego z tablicą fotoelementów (UV-VIS-DAD). W badaniach uwzględniono także kolumnową wysokosprawną elucyjną chromatografię cieczową w odwróconych układach faz (RP-HPLC), posiadającą zwiększającą się ostatnio zasób literatury dla badania siarki rodzimej w środowisku naturalnym. Badano także przydatność cienkowarstwowej chromatografii cieczowej w normalnych oraz odwróconych układach faz (NP-TLC / RP-TLC). Jednakże ostatnie techniki są możliwe do zastosowania w identyfikacji oraz oznaczaniu siarki rodzimej tylko w warunkach jej wysokich zawartości w analitach. Na podstawie badań wykazano, że najbardziej korzystnymi warunkami ekstrakcji i ługowania siarki rodzimej w glebach mogących jednocześnie zawierać nisko i średnio polarne zanieczyszczenia pochodzenia naftowego oraz po-węglowego, jest ekstrakcja / ługowanie rozpuszczalnikiem alifatycznym, np. n-heksanem. Natomiast optymalnymi warunkami do rozdzielania, identyfikacji oraz oznaczania siarki elementarnej, a także – w razie takiej potrzeby – oznaczania obecności i zawartości - nisko i średnio polarnych zanieczyszczeń gleby, ekstrahowanych razem z siarką rodzimą jest wykorzystanie techniki NP-HPLC/ UV-VIS-DAD. Ważne znaczenie w niniejszych badaniach ma możliwość identyfikacji analitu, nie tylko na podstawie parametrów retencji, ale także na podstawie charakterystyki widma w zakresie ultrafioletu i światła widzialnego, tzn., z zastosowaniem detektora spektrofotometrycznego z tablicą fotoelementów, UV-VIS-DAD.

Słowa kluczowe: monitoring środowiska, chemia analityczna, gleby, wysokosprawna kolumnowa chromatografia cieczowa, siarka rodzima, wydzielenie, identyfikacja, oznaczanie, detekcja UV-VIS-DAD

Alternative methods of isolation, identification and determination of elemental sulfur in the soil with used extraction to low polar liquid, liquid chromatography and spectrophotometry

Abstract: In the present study - based on literature review and research - developed new methods of isolation, separation from components associated, identification and determination of elemental sulfur in the soil, especially contaminated with low-volatile products derived from crude oil. Used sulfur extraction, low and medium polar constituents of soils to non-polar n-hexane. Separated components of the extracts by using elution column high performance liquid chromatography technique in normal phase systems (NP-HPLC) with spectrophotometric detection in the ultraviolet and the visible light range with array of photoelements (UV-VIS-DAD). The studies also included an elution column high performance liquid chromatography in reversed-phase systems (RP-HPLC) having increasing lately resource literature for the study of native sulfur in the environment. Has also been studied the suitability of the thin layer chromatography in normal and reverse phase systems (NP-TLC / RP-TLC). However, recent techniques are possible for use in the identification and determination of native sulfur only in terms of its high content in analytes. Studies have shown that the most preferred extraction and leaching conditions, of native sulfur in the soil which may contain also low and medium polar impurities, and the petroleum-carbon, is the extraction / leaching of aliphatic solvent, eg. N-hexane. While the optimum conditions for the separation, identification and determination of the elemental sulfur, and - if necessary - the determination of the presence and the content of - low and medium polar soil contaminants, extracted with native sulfur is the use of the NP-HPLC / UV-VIS-DAD technique. Great importance in this study has the ability to identify the analyte based not only on retention parameters, but also on the basis of a characteristic spectrum in the ultraviolet and visible light, ie., using a spectrophotometric detector with an array of photoelements, UV-VIS-DAD.

Keywords: analytical chemistry, high performance column liquid chromatography, native sulfur, soil, environmental monitoring, secretion, identification, determination, detection UV-VIS-DAD

1. Wstęp (Introduction)

Siarka jest jednym z pierwiastków, który w postaci rodzimej, a także organicznych i nieorganicznych związków chemicznych znajduje się z wielu przyczyn w różnego rodzajach gleb. Jest jednym z niezbędnych pierwiastków dla organizmu żywego (głównie w postaci chemicznych związków), ale także dla świata roślin (również w formie elementarnej) [1]. W glebie w rezultacie przemian chemicznych, zwłaszcza, mikrobiologicznych, może być przekształcana do formy siarki rodzimej, tzn. pierwiastka. Istnieją też inne przyczyny, które powodują, iż siarka może dostawać się do gleby w formie siarki rodzimej i znajdować się tam w różnych, czasem bardzo wysokich zawartościach (rejonny wydobycia, magazynowania i przeładunku siarki, a także gleby, gdzie jako nawóz sztuczny zawierał siarkę lub tiosiarczany w celu jej wykorzystania jako tzw. mikroelement gleby).

W niektórych miejscach obecność i zawartość siarki rodzimej w glebie może być szczególnie wysoka. Dotyczy to rejonów odkrywkowych kopalni siarki [3], zbiorników z płynną siarką, a także wszystkich tych zakładów, gdzie ma miejsce składowanie oraz dystrybucja siarki w postaci stałej, albo płynnej, w tym, nowoczesnych rafinerii ropy naftowej lub zakładów produkcji kwasu siarkowego [4].

Niniejsza publikacja, bazująca na pracy badawczej, dotyczy metodyk badania obecności oraz zawartości siarki w formie rodzimej w glebach. Studia i badania tego rodzaju są celowe, także ze względu na istnienie dość ubogiej, ostatnio wzbogacanej, literatury odnoszącej się do problematyki monitorowania środowiska pod względem obecności siarki w glebie [5, 14].

Obszary, gdzie może do gleby dostać się siarka w formie pierwiastkowej (rodzimej) najprawdopodobniej wcale nie są niewielkie, uwzględniając zdolność siarki do sublimacji i resublimacji. Poprzez swoje właściwości, jak możliwość mikrobiologicznego oraz chemicznego przekształcania w różnego rodzaju pochodne organiczne i nieorganiczne, obecność siarki w podwyższonej zawartości może wpływać negatywnie na środowisko, poprzez skażenie gleb i wód podziemnych, w tym szczególnie siarkowodorem, lub organicznymi związkami chemicznymi siarki [6, 7]. Siarka w postaci utlenionej jako S^{+IV} , to głównie ditlenek siarki (SO_2) oraz nieorganiczne jony SO_3^{2-} . Szczególnie ditlenek siarki oraz pochodne, w tym tritlenek siarki (SO_3) oraz kwas siarkowy (VI) (H_2SO_4), stanowią istotny problem w zakresie skażenia środowiska.

Badania opisane w niniejszej publikacji mogą mieć również znaczenie dla gleboznawstwa oraz rolnictwa, ponieważ z punktu widzenia fizjologii roślin niewielka zawartość siarki rodzimej w glebie jest pożądana [8].

1.1. Przegląd literatury - metodyki identyfikacji i oznaczania siarki elementarnej w środowisku naturalnym (Literature review - methods of identification and determination of elemental sulfur in the environment)

Poznane metodyki identyfikacji oraz oznaczania siarki rodzimej w środowisku naturalnym można podzielić na trzy grupy. Pierwsza grupa to metodyki, w których siarkę oznacza się w sposób pośredni poprzez przekształcenie jej do innych chemicznych form (metodyki stosowane w okresie 1954-1997). Druga grupa, to metodyki bezpośrednie oznaczania siarki elementarnej bez jej transformacji (metodyki stosowane od 1997 do dzisiaj) oraz trzecia – grupa, to metodyki potencjalne, czyli te, które mogą posłużyć do identyfikacji i oznaczania siarki, zwłaszcza na niskich poziomach stężeń z dodatkowymi sposobami potwierdzenia identyfikacji (np. GC-MS, HPLC UV-VIS-DAD lub HPLC-MS itp.) [9].

W przypadku nieobecności związków siarki i obecności wyłącznie siarki rodzimej, najprostszym sposobem oznaczania jest jej utlenienie do postaci SO_4^{2-} i miareczkowanie mianowanym, rozcieńczonym roztworem $BaCl_2$ z wytrąceniem całkowicie nierozpuszczalnego w wodzie $BaSO_4$.

Za jedną z pierwszych metodyk identyfikacji oraz oznaczania siarki elementarnej w obecności związków siarki, uważa się kolorymetrię [10]. Technika kolorymetrii, to technika analityczna, która określa stężenia roztworu barwnego za pomocą wizualnego porównania intensywności barwy roztworu badanego z intensywnością barwy wzorców. Wyekstrahowaną elementarną siarkę, poprzez dodanie jonów cyjanku (CN^-) przekształca się w jon tiocyjanowy (SCN^-). Następnie miareczkuje kationem żelaza (Fe^{3+}), do uzyskania w sposób ilościowy $[Fe(SCN)_6]^{3-}$ i oznacza się na podstawie stopnia intensywności czerwonej barwy powstałego kompleksowego jonu (Metodyka Filermans'a i Brock's 1978) [10].

Modyfikacja przez Trolsen'a i Jorgensen'a (w 1982) metody Filermans'a i Brock's polega na dodaniu octanu cynku do roztworu, aby wyeliminować zakłócenia spowodowane obecnością siarczków w badanej próbce. Po modyfikacji oraz udoskonaleniu metodyki dolna granica oznaczalności (LOQ) oraz precyzja mieściła się w granicach 0,8-8 ppm (0,025-0,25 mM) zawartości siarki w badanym roztworze ekstrakcyjnym. Jednakże pozostało jeszcze wiele czynników wpływających na jakość analizy, do których należą: stężenie jonów Fe^{3+} i CN^- oraz stabilność jonu $[Fe(SCN)_6]^{3-}$ [9].

Inną techniką analityczną wykorzystywaną do oznaczenia oraz identyfikacji siarki rodzimej była polarografia. Metoda polegała na przyłożeniu liniowo wzrastającego potencjału elektrycznego do kroplowej elektrody rtęciowej będącej elektrodą pracującą z cyklicznie odnawianą w trakcie pomiaru powierzchnią i rejestracji natężenia prądu płynącego przez nią. Wartość stężenia obecnej w roztworze substancji (ulegającej utlenianiu lub redukcji) była proporcjonalna do wartości natężenia prądu. Siarkę elementarną przekształcono do tiosiarczanu ($S_2O_3^{2-}$) poprzez dodawanie siarczanu sodu (VI) (Na_2SO_4). Późniejsze badania wykazały, iż czułość metody może wzrosnąć do $5 \mu M$ (w roztworze) poprzez zastosowanie polarografii z zróżnicowanym impulsem [12].

Inne metodyki oznaczania siarki rodzimej w roztworach bazowały na interakcji siarki z pokrytymi na powierzchni aktywną miedzią, specjalnie preparowanymi płytkami do uzyskania siarczku miedzi (CuS). Następnie uwalniany był siarkowodór (H_2S) w formie gazowej za pomocą roztworu kwasu solnego (HCl). Potem modyfikowano metodę – przekształcano otrzymywany siarkowodór (H_2S) do siarczanu baru ($BaSO_4$) (w obecności H_2O_2 oraz w warunkach wrzenia) - $BaSO_4$ był oznaczany metodą grawimetryczną, natomiast uwolniony siarkowodór oznaczany był metodą jodometryczną [13, 14].

Kolejną modyfikacją metody oznaczania siarki elementarnej za pomocą siarczku miedzi było wkładanie blaszki z CuS oraz srebrnej folii do jednej ampułki, którą przepłukiwano czystym tlenem (w temp. $450^\circ C$). W tych warunkach dochodziło do przekształcania siarczku miedzi w siarczan srebra (Ag_2SO_4) (później rozpuszczany w wodzie), który oznaczany był za pomocą chromatografii jonowej [9].

Powyższe metodyki oznaczania siarki rodzimej są skomplikowane oraz czasochłonne. We wszystkich tych przypadkach, aby można było oznaczyć siarkę należy ją najpierw przekształcić w inną formę (zależną od metodyki), co powoduje obniżenie dokładności oraz precyzji pomiaru.

Od 1997 za podstawową metodykę identyfikacji oraz oznaczania zawartości siarki w próbkach środowiskowych uważa się chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas ($GC-MS$) [15]. Stosowana też była wysokosprawna kolumnowa chromatografia cieczowa w normalnych oraz odwróconych układach faz ($NP-HPLC$ oraz $RP-HPLC$) i metodyki jodo-azydkowe.

Oznaczanie obecności i zawartości siarki elementarnej w glebach, a także w innych materiałach realizuje się z wykorzystaniem instrumentalnych metodyk analityki chemicznej, które należy poprzedzić ekstrakcją, a niekiedy – dodatkowo-wzbogaceniem próbki we wzorzec. Do tego celu najczęściej stosowane są różne techniki rozdzielania oraz wzbogacania. Najczęściej ekstrakcja siarki polega na ługowaniu acetonem, chloroformem, dichlorometanem lub metanolem [14]. Ważne znaczenie posiada również dobór ekstrahentu, który powinien w dostatecznym stopniu rozpuszczać siarkę, a przy okazji korzystnie-innego rodzaju zanieczyszczenia gleby, ale nie powinien wcale lub w minimalnym stopniu rozpuszczać naturalnych składników gleb, szczególnie przeszkadzających w analizie S_8 .

Siarka elementarna jest w różnym stopniu rozpuszczalna w wielu niepolarnych lub średnio polarnych rozpuszczalnikach, rozpuszczalność siarki elementarnej w różnego rodzaju rozpuszczalnikach przedstawiona została w tabeli nr 1.

Tabela 1. Rozpuszczalność siarki w rozpuszczalnikach.

Table 1. Sulfur solubility in solvents.

| Lp. | Rozpuszczalnik (Solvent) | Rozpuszczalność (Solubility) | Bibliografia (Bibliography) |
|-----|---------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| 1. | Aceton | 604, 623, 610 ($\mu g/ml$) | [14] |
| 2. | Dichlorometan | 6185, 6089, 6720 ($\mu g/ml$) | |
| 3. | Chloroform | 6670 ($\mu g/ml$) | |
| 4. | Metanol | 260, 247, 265 ($\mu g/ml$) | |
| 5. | Etanol | 0,066 % masy | [22] |
| 6. | Eter dimetylowy | 0,181 % masy | |
| 7. | Formamid dimetylowy (DMF) | 0,191% masy | |
| 8. | n-Heksan | 0,40% masy | |
| 9. | Czterochlorek węgla | 0,832 % masy | |
| 10. | Nitrobenzen | 0,856 % masy | |
| 11. | Chloroform | 1,164 % masy | |
| 12. | Anilina | 1,259 % mas | |
| 13. | Ksylene | 2,051 % masy | |
| 14. | Toluen | 2,070 % masy | |
| 15. | Benzen | 2,093 % masy | |
| 16. | Chlorobenzen | 2,370 % masy | |
| 17. | Disiarczek węgla | 34,8 % masy | |

Natomiast nie rozpuszcza się ona całkowicie w wodzie oraz jest prawie nierozpuszczalna w rozpuszczalnikach polarnych, takich jak alkohole, kwasy organiczne itp. Rozpuszczalnik/ekstrahent siarki elementarnej nie powinien jednak absorbować światła w zakresie UV-VIS oraz ekstrahować naturalnych składników gleb. Korzystną właściwością ekstrahentu powinna być też zdolność ekstrakcji zanieczyszczeń gleby, ale nie naturalnych składników gleby, szczególnie składników przeszkadzających w identyfikacji i oznaczaniu zawartości siarki oraz zanieczyszczeń gleby pochodzenia endogenego. Spośród nisko polarnych rozpuszczalników najbardziej korzystny wydaje się n-heptan, lub n-heksan, ew. cykloheksan. Natomiast, nie nadaje się toluen- znany dobrze rozpuszczalnik siarki- z powodu szerokiego zakresu absorpcji światła UV. Z tego samego powodu, ale także ze względu na bardzo wysoką lotność nie znajduje zastosowania dichlorometan (CH_2Cl_2 ; DCM).

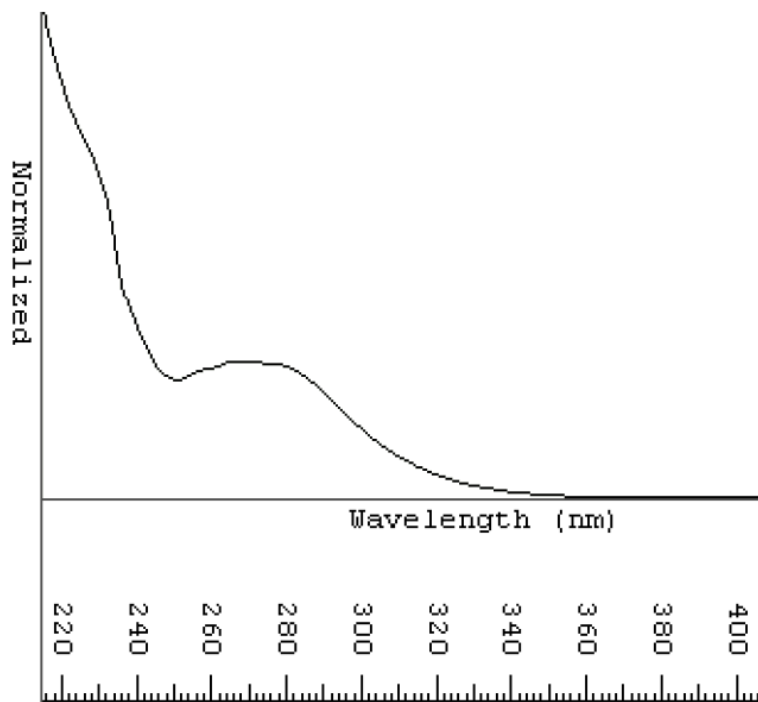
Zalecane we współczesnej literaturze metody ekstrakcji, rozdzielania, identyfikacji oraz oznaczania siarki elementarnej w próbkach środowiskowych przedstawiono w tabeli nr 2. Zamieszczone w tabeli nr 2 dane wskazują, że rodzaj użytego ekstrahenta zależy od rodzaju próbki. W przypadku próbek gleby stosowany jest dichlorometan i aceton.

Do oznaczania obecności i zawartości siarki w glebie wykorzystuje się głównie chromatografię gazową (GC) oraz wysokosprawną chromatografię kolumnową w odwróconych układach faz (RP-HPLC) [14, 21].

Do potencjalnych technik analitycznych, na podstawie dokonanego przeglądu literatury, które można zastosować do identyfikacji oraz oznaczania rodzimej siarki w glebie należą:

- Cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (TLC),
- Wysokosprawną kolumnową chromatografię cieczową (HPLC),
- Spektrometria UV-VIS,
- Chromatografia gazowa GC-TCD (Thermal Conductivity detector),
- Chromatografia gazowa GC-ECD (Electron capture detector),
- Chromatografia gazowa GC-FPD (Flame Photometric Detector).

W przypadku TLC parametrem odpowiadającym za identyfikację siarki elementarnej w glebie jest współczynnik retencji, a za oznaczanie zawartości - intensywność plamki mierzona w warunkach optymalnych (fotografowanie płytki w specjalnej komorze, aby światło rozkładało się równomiernie oraz specjalnego oprogramowania za pomocą którego można odczytać intensywność plamki). W przypadku HPLC siarkę elementarną oznacza się jakościowo i ilościowo. Dodatkowym parametrem odpowiadającym za identyfikację w technice HPLC może być widmo siarki w zakresie UV z zastosowaniem detekcji UV-VIS-DAD.



Rys.1. Widmo siarki elementarnej w zakresie nadfioletu (UV)
 Fig.1. The spectrum of elemental sulphur in the UV-light range

Do identyfikacji oraz oznaczania siarki w próbkach gleby może być zastosowana stacjonarna spektrofotometria UV-VIS, ponieważ siarka charakteryzuje się specyficznym widmem w zakresie UV -Rys. 1. (widmo wykonane w badaniach własnych), jednakże tylko wówczas gdy ekstrakt z całą pewnością nie zawiera innych składników absorbujących UV w zakresie 220 do 350 nm. Technika spektroskopii w zakresie średniej podczerwieni (MIR - FTIR – Middle Infrared Fourier Transformation Spectroscopy) jest natomiast

zupełnie nieprzydatna do identyfikacji, ani do oznaczania siarki elementarnej, ponieważ cząsteczka siarki S₈ jest całkowicie symetryczna i zupełnie nie absorbuje światła UV. Taki przebieg widma MIR – FTIR potwierdza też, że mamy do czynienia właśnie tylko z siarką (S₈).

Tabela 2. Metody ekstrakcji, rozdzielania, identyfikacji oraz oznaczania siarki elementarnej w próbkach środowiskowych.
Table 2. Methods of extraction, separation, identification and determination of elemental sulfur in environmental samples.

| Rodzaj próbki środowiskowej (Type of environmental samples) | Metody ekstrakcji siarki elementarnej z środowiskowych próbek (Methods for extracting elemental sulfur from environmental samples) | Metodyki rozdzielania, identyfikacji oraz oznaczania siarki elementarnej (Methods of separation, identification and determination of elemental sulfur) | Bibliografia (Bibliography) |
|---|---|---|-----------------------------|
| Osady dennie (Bottom sediments) | Ekstrakcja siarki z próbek środowiskowych z wykorzystaniem n-heksanu oraz cykloheksanu jako rozpuszczalników, a następnie z wykorzystaniem 5% NaNO ₂ azotynu sodu w DMF (dimetyloforamidu) w celu usunięcia wiązań S-S, a następnie metanolem (1:6) i poddane oznaczeniu | Metoda jodo-azydkowa – oznaczanie siarki elementarnej w bezwodnym środowisku | [17] |
| Węgiel (Coal) | Ekstrakcja siarki z próbek środowiskowych z wykorzystaniem cykloheksanu oraz tetrachloroetanu jako rozpuszczalnika – ekstrakcja w aparacie Soxhleta | Chromatografia gazowa ze spektrometrią mas (GC-MS) – kolumna Hp-5 capillary column (30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 µm- grubość powłoki, Crosslinked 5X PH ME Siloxane; gaz nośny: 0,6 ml/min He; objętość dozowania 5 µl (podział iniekcji 1:10); spektrometr ustawiony na napięcie jonizacji 70 eV. | [15] |
| Osady dennie (Bottom sediments) | Brak informacji w artykule źródłowym | Wysokosprawna chromatografia cieczowa kolumnowa w odwróconym układzie faz (RP-HPLC)- Warunki: brak informacji w artykule źródłowym | [16] |
| Osady jeziorne (Lake sediments) | Ekstrakcja siarki z próbek środowiskowych z wykorzystaniem czterochlorku węgla jako rozpuszczalnika | Chromatografia gazowa ze spektrometrią mas (GC-MS) – kolumna Silic acapillary (I.D. 25 mm) okryta niepolarną powierchnią związaną SPB-1 (0,25 µm grubości); gaz nośny: Ultra czysty hel; ciśnienie 90kPa; potencjał jonizacji 70 eV; temp. w kolektorze 220-280°C | [9] |
| Osady morskie (Sea sediments) | Ekstrakcja siarki z próbek środowiskowych z wykorzystaniem acetonu jako rozpuszczalnika | Wysokosprawna chromatografia cieczowa kolumnowa w odwróconym układzie faz (RP-HPLC)- brak informacji w artykule źródłowym | [16] |
| Osady powierzchniowe (surface sediments) | Brak informacji w artykule źródłowym | Linowa woltamperometria (LSV)- Warunki: brak informacji w artykule źródłowym | [16] |
| Węgiel, pył, gleba, woda (Coal, dust, soil, water) | Węgiel, pył, gleba - Ekstrakcja siarki z próbek środowiskowych z wykorzystaniem cykloheksanu – jako rozpuszczalnika – ekstrakcja w aparacie Soxhleta Woda – ekstrakcja z wykorzystaniem sita 40-60 mesh XAD-2, a następnie rozpuszczenie siarki w eterze dietylowym oraz cykloheksanie | Chromatografia gazowa (GC)- kolumna szklana 2 m x 4mm i.d. pakowana: 5% OV-210/4% SE-30, chromosorb WHP, 80-100 mesh; temp. kolumny 180°C, przepływ: 75 ml/min, tr=2,3 min | [20] |
| Runo leśne (Undergrowth) | Ekstrakcja siarki z próbek środowiskowych z wykorzystaniem acetonu jako rozpuszczalnika | Metoda kolorymetryczna z użyciem chlorku żelaza, chlorku rtęci oraz cyjanku sodu, oznaczanie w wykonanej za pomocą spektrofotometru -465 nm, | [18] |
| Gleba (Soil) | Ekstrakcja siarki z próbek środowiskowych z wykorzystaniem dichlorometanu oraz acetonu jako rozpuszczalnika | Wysokosprawna chromatografia cieczowa kolumnowa RP-HPLC: m Kolumna C18, 100mm x 4,6 mm, ID, 3,5 µm, przepływ: 2,3 ml/min; faza ruchoma: 90:10 MeOH:Woda (v:v); Długość fali monitorowanej: 220 nm; Temp. kolumny: 45°C, Objętość dozowania: 10 µl | [14] |

1.2. Zakres badań (Scope of research)

Celem prac badawczych było opracowanie optymalnych warunków przygotowania próbek, rozdzielania składników ekstraktu, identyfikacji oraz oznaczania elementarnej siarki w glebie technikami chromatografii cieczowej uwzględniając wysokosprawną kolumnową elucyjną chromatografię cieczową w normalnych oraz odwróconych układach faz (NP-HPLC oraz RP-HPLC) oraz zbadanie dokładności i precyzji

oznaczania. Zakres badań obejmował również przygotowanie wstępnej procedury identyfikacji oraz oznaczania siarki w glebie techniką chromatografii cieczowej.

Postępowanie w zakresie poboru i przygotowania próbek do badań składników i innych parametrów gleb powinno uwzględnić zasady opisane w normach międzynarodowych [21]:

- PN-ISO 11464:1999 Jakość gleby - Wstępne przygotowanie próbek do badań fizyczno-chemicznych, Pobór prób gleb należy przeprowadzić zgodnie z wymaganiami norm:
- PN-ISO 10381-1:2008 Jakość gleby -- Pobieranie próbek – Część 1: Zasady opracowywania programów pobierania próbek,
- PN-ISO 10381-2:2007 Jakość gleby - Pobieranie próbek – Część 2: Zasady dotyczące technik pobierania,
- PN-ISO 10381-3:2007 Jakość gleby -- Pobieranie próbek – Część 3: Zasady dotyczące bezpieczeństwa
- PN-ISO 10381-4:2007 Jakość gleby - Pobieranie próbek – Część 4: Zasady dotyczące postępowania podczas badań terenów naturalnych, zbliżonych do naturalnych oraz uprawnych.
- PN-R-04031:1997 Analiza chemiczno-rolnicza gleby. Pobieranie próbek.

2. Część eksperymentalna (*Experimental part*)

2.1. Materiały (*Materials*)

2.1.1. *Rozpuszczalnik i eluenty - TLC* (*Solvents and eluents - TLC*)

W badaniach zastosowano następujące rozpuszczalniki stanowiące ekstrahenty, eluenty lub składniki eluentów- badanie techniką TLC:

- n-heksan (n-C6) do HPLC Merck (Niemcy),
- dichlorometan (DCM) pure min. 99% Chempur (Polska)
- eter tert-butyloowo-metylowy (MTBE) do HPLC Merck (Niemcy),
- tetrahydrofuran (THF) do HPLC Merck (Niemcy),
- acetonitryl (ACCN) LiChrosolv (Niemcy),
- aceton cz.d.a. POCh (Polska).
- izopropanol (IzOH) cz.d.a. POCh (Polska)

2.1.2. *Rozpuszczalniki i eluenty - HPLC* (*Solvents and eluents*)

W badaniach zastosowano następujące rozpuszczalniki stanowiące ekstrahenty, eluenty lub składniki eluentów- badanie techniką TLC:

- n-heksan (n-C6) do HPLC Merck (Niemcy),
- dichlorometan (DCM) pure min. 99% Chempur (Polska)
- eter tert-butyloowo-metylowy (MTBE) do HPLC Merck (Niemcy),
- acetonitryl (ACCN) LiChrosolv (Niemcy),
- aceton cz.d.a. POCh (Polska).
- izopropanol (IzOH) cz.d.a. POCh (Polska)

2.1.3. *Substancje wzorcowe i badane próbki - TLC* (*Reference substances and examined samples - TLC*)

Materiały (wzorce oraz próbki) użyte do badań techniką TLC:

- wzorce siarki elementarnej – roztwór nasycony S₈ w nC₆,
- 1 g gleby pobrany z okolic Politechniki Gdańskiej ekstrahowany w 3 ml nC₆ (próbka pobrana na głębokości 5 cm),
- 1 g gleby pobrany z okolic Politechniki Gdańskiej ekstrahowany w 3 ml nC₆ (próbka pobrana na głębokości 30 cm),
- 1 g gleby pobrany z okolic Rafinerii Gdańskiej – Lotos Lab. ekstrahowany w 3 ml nC₆ (próbka pobrana na głębokości 5 cm),
- 1 g gleby pobrany z okolic Rafinerii Gdańskiej – Lotos Lab. ekstrahowany w 3 ml nC₆ (próbka pobrana na głębokości 30 cm),

- 1 g gleby pobrany z okolic Zakładu Chemicznego ekstrahowany w 3 ml nC6 (próbka pobrana na głębokości 5 cm),
- 1 g gleby pobrany z okolic Zakładu Chemicznego ekstrahowany w 3 ml nC6 (próbka pobrana na głębokości 30 cm).

2.1.4. Substancje wzorcowe i badane próbki - HPLC (Reference substances and examined samples - HPLC)

Materiały (wzorce oraz próbki) użyte do badań techniką HPLC:

- wzorce siarki elementarnej – roztwór nasycony S₈ w rozpuszczalniku,
- 1 g gleby pobrany z okolic Politechniki Gdańskiej ekstrahowany w 3 ml rozpuszczalnika (próbka pobrana na głębokości 5 cm),
- 1 g gleby pobrany z okolic Politechniki Gdańskiej ekstrahowany w 3 ml rozpuszczalnika (próbka pobrana na głębokości 30 cm),
- 1 g gleby pobrany z okolic Rafinerii Gdańskiej – Lotos Lab. ekstrahowany w 3 ml rozpuszczalnika (próbka pobrana na głębokości 5 cm),
- 1 g gleby pobrany z okolic Rafinerii Gdańskiej – Lotos Lab. ekstrahowany w 3 ml rozpuszczalnika (próbka pobrana na głębokości 30 cm),
- 1 g gleby pobrany z okolic Zakładu Chemicznego ekstrahowany w 3 ml rozpuszczalnika (próbka pobrana na głębokości 5 cm),
- 1 g gleby pobrany z okolic Zakładu Chemicznego ekstrahowany w 3 ml rozpuszczalnika (próbka pobrana na głębokości 30 cm).

W zależności od fazy ruchomej rozpuszczalnikami były:

- n-heksan (n-C6) do HPLC Merck (Niemcy),
- dichlorometan (DCM) pure min. 99% Chempur (Polska)
- eter tert-butyloowo-metylowy (MTBE) do HPLC Merck (Niemcy),
- acetonitryl (ACCN) LiChrosolv (Niemcy),
- aceton cz.d.a. POCh (Polska).
- acetonitryl (ACCN) +1% izopropanol (IzOH)
- aceton + 0,25% izopropanol (IzOH)
- MTBE+0,25% IzOH
- MTBE+5% IzOH

2.2. Aparatura i wyposażenie- TLC (Instruments and equipments -TLC)

Aparatura, wyposażenie dla dwóch rodzajów badań techniką cienkowarstwowej chromatografii cieczowej w normalnych oraz odwróconych układach faz (NP-TLC / RP-TLC) przedstawiono w tabeli nr 3.

Tabela 3. Aparatura, wyposażenie użyte w badaniu techniką TLC (NP-TLC oraz RP-TLC)

Table 3. Apparatus and equipment used in the technique TLC (NP-TLC and RP-TLC)

| Aparatura oraz wyposażenie (Apparatus and equipment) | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Lampa UV TB Telbid typ TB 02, długość fali 254 i 365 nm • Strzykawka: Mikrostrzykawka chromatograficzna o maksymalnej pojemności 100 µL • Szklana komora chromatograficzna • Bibuła do chromatografii cienkowarstwowej • Wirówka | |
| Technika (Technique) | Rodzaj płytki TLC |
| NP-TLC | Płytki TLC Silicagel 60 F ₂₅₄ (HX55003535, firma Merck, kraj pochodzenia Niemcy) z fluoresceiną, o wymiarach 5 x 10 cm |
| RP-TLC | Płytki TLC Silicagel 60 RP-18 F ₂₅₄ S (HX44673134, firmy Merck, kraj pochodzenia Niemcy) o wymiarach 5 x 7 cm |

2.3. Aparatura i wyposażenie- HPLC (Instruments and equipments -HPLC)

Aparatura oraz wyposażenie użyte do analizy techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej kolumnowej w normalnym oraz odwróconym układzie faz HPLC (NP-HPLC oraz RP-HPLC) przedstawione zostały w tabeli nr 4.

Tabela. 4. Aparatura oraz wyposażenie zastosowane w analizach techniką HPLC (NP-HPLC oraz RP-HPLC).

Table. 4. Instruments and equipment used in HPLC technique analyzes (NP-HPLC and RP-HPLC).

| Aparatura /wyposażenie (Apparatus and equipment) | Charakterystyka (opis)(Characteristics (description)) |
|--|---|
| Aparat chromatograficzny (Chromatographic apparatus) | Chromatograf ciekowy LaChrom (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia), wyposażony w czterokanałowy system elucji gradientowej z zaworami proporcjonującymi, wyposażony w pompę Hitachi L-7110, zawór dozujący Rhodyne Rh-7125i z pętlą dozującą 1200 µL oraz termostat Cobrabit 7350i-Polska |
| Detektory (Detectors) | detektor spektrofotometryczny z matrycą fotodiodową typu UV-DAD L-7450A oraz detektor refraktometryczny RID L-7490 –połączone szeregowo |
| Oprogramowanie (Software) | oprogramowanie HSM-7000, wersja 3.1.1. |
| Strzykawka (Syringe) | mikrostrzykawką chromatograficzną o maksymalnej pojemności 100 µL |
| Wirówka (Centrifuge) | Wirówka do odwirowania osadu w fiolkach z roztworami |

2.4. Warunki chromatograficzne - TLC (Chromatographic conditions – TLC)

Warunki chromatograficzne użyte w badaniu techniką NP-TLC:

- Fazy ruchome:
 - n-heksan (n-C6) do HPLC Merck (Niemcy),
 - eter tert-butyloowo-metylowy (MTBE) do HPLC Merck (Niemcy),
 - n-heksan (n-C6) + 5% MTBE
 - MTBE+ 0,25% izopropanolu (IzOH)
- Objętość dozowanej próbki: 5 µl / 50 µl
- Płytki: Płytki TLC Silicagel 60 F₂₅₄ (HX55003535, firma Merck, kraj pochodzenia Niemcy) z fluoresceiną, o wymiarach 5 x 10 cm
- Stężenie próbki: 1 g gleby / 3 ml rozpuszczalnika

Warunki chromatograficzne użyte w badaniu techniką RP-TLC:

- Fazy ruchome:
 - n-heksan (n-C6) do HPLC Merck (Niemcy),
 - tetrahydrofuran (THF) do HPLC Merck (Niemcy),
 - acetonitryl (ACCN) LiChrosolv (Niemcy),
 - MTBE+ 0,25% izopropanolu (IzOH)
 - MTBE + 5% izopropanolu (IzOH)
 - n-heksan (n-C6) + 0,25% izopropanolu (IzOH)
 - n-heksan (n-C6) + 1% izopropanolu (IzOH)
 - dichlorometan (DCM) + 0,25% izopropanolu (IzOH)
 - tetrahydrofuran (THF) + 0,25% izopropanolu (IzOH)
 - tetrahydrofuran (THF) + 1% izopropanolu (IzOH)
 - aceton +0,25% izopropanolu (IzOH)
 - acetonitryl (ACCN)+1% IzOH
- Objętość dozowanej próbki: 5 µl / 50 µl
- Płytki: Płytki TLC Silicagel 60 RP-18 F₂₅₄S (HX44673134, firmy Merck, kraj pochodzenia Niemcy) o wymiarach 5 x 7 cm
- Stężenie próbki: 1 g gleby / 3 ml rozpuszczalnika

2.5. Warunki chromatograficzne - HPLC (Chromatographic conditions – HPLC)

Warunki chromatograficzne wykorzystane do badania techniką wysokosprawnej chromatografii ciekowej kolumnowej w normalnym oraz odwróconym układzie faz HPLC (NP-HPLC oraz RP-HPLC) przedstawione zostały w tabeli nr 5.

Tabela. 5. Warunki chromatograficzne zastosowane w badaniu techniką HPLC (NP-HPLC oraz RP-HPLC).
 Table. 5. *Chromatographic conditions used in HPLC technique (NP-HPLC and RP-HPLC).*

| Warunki stałe dla wszystkich analiz techniką HPLC (NP-HPLC oraz RP-HPLC) (Constant conditions for all analyzes HPLC (NP-HPLC and RP-HPLC)) | |
|---|---|
| Objętość dozowanej próbki (<i>Volume of dosing sample</i>) | 25 µL |
| Przepływ (<i>Flow</i>) | 2 ml/min |
| Kolumny HPLC (<i>HPLC kolumn</i>) | |
| NP-HPLC | Kolumna Macherey-Nagel HPLC 250x4 mm, pakowana z Nucleosil SiO ₂ , 100Å, 3 µm (Niemcy) |
| RP-HPLC | Kolumna Symmetry C18, 100A, 5 µm, 4,6 mm X 250 mm, (Waters, USA) |
| Technika (<i>Technique</i>) | Faza ruchoma |
| NP-HPLC | n-heksan (nC6) |
| | MTBE |
| RP-HPLC | n-heksan (nC6) |
| | dichlorometan (DCM) |
| | acetonitryl (ACN) |
| | acetonitryl (ACN) +1% izopropanol (IzOH) |
| | aceton |
| | aceton + 0,25% izopropanol (IzOH) |
| | MTBE |
| | MTBE+0,25%IzOH |
| | MTBE+5%IzOH |

2.7. Przygotowanie badanych próbek dla obu technik (TLC i HPLC) (Preparation of tested samples for both techniques (TLC and HPLC))

Każdą próbkę gleby pobierano z dwóch głębokości 5 i 30 cm, masa próbki mieściła się w granicach 200-300 g. Następnie metodą ćwiartowania wydzielono po 1,00 g gleby (+/- 0,01 g) do szklanej fiolki i dodawano 3,00ml (+/- 0,01 ml) rozpuszczalnika/ekstrahenta. Potem potrząsano energicznie każdą fiolką, aby siarka i inne składniki gleby wyekstrahowały. Po 10 min energicznego wytrząsania odwirowano osad na wirówce (1400 obrotów/min).

2.8. Przygotowanie wzorców dla obu technik (TLC i HPLC) (Preparation of standards for both techniques (TLC and HPLC))

W celu przygotowania roztworów wzorcowych siarki odważono 0,20 mg siarki (+/-0,01 mg) (w postaci siarki elementarnej S₈) do fiolki i dodano 1 ml rozpuszczalnika. Następnie energicznie potrząsano fiolką przez około 2 min (aby osad-siarka się rozpuścił).

2.9. Metody postępowania - TLC (Methods - TLC)

Na płytkę TLC nanoszono 5 µl / 50 µl najpierw wzorca siarki elementarnej (pierwsza plamka), a następnie roztworów przygotowanych z pobranych próbek gleby ekstrahowanych w n-heksanie. Plamki znajdowały się w odległości 1 cm od siebie. Odparowano n-heksan pod wyciągiem, a następnie rozwinięto poszczególne płytki w zależności od badania, w różnych rozpuszczalnikach. Wszystkie płytki poddane były wizualizacji pod lampą UV w świetle 254 oraz 365 nm.

2.10. Metody postępowania - HPLC (Methods - HPLC)

Ustabilizowano układ chromatograficzny. Następnie ustawiono prędkość przepływu eluentu na 2,0 ml/min. Następnie wprowadzono do pętli zaworu dozującego (za pomocą strzykawki chromatograficznej) kolejno próbki o objętości 25 µl.

3. Wyniki (Results)

3.1. Wyniki – identyfikacja siarki w próbkach gleby techniką TLC (Results - identification of sulfur in the soil samples by TLC technique)

Przeprowadzono identyfikacje siarki elementarnej w próbkach za pomocą współczynnika R_f oraz k . Wszystkie wartości przedstawione zostały w tabeli nr 6 (gdzie a odległość plamki od startu [cm], b – długość całkowita rozawijania [cm]).

Tabela 6. Zestawienie wartości współczynników: R_f (współczynnika opóźnienia), k (współczynnika retencji) dla układów TLC pod światłem 254 nm dla wzorca siarki (roztwór nasycony siarki elementarnej)

Table 6. Summary of factors: R_f (coefficient of delay), k (retention factor) for TLC systems under the light of 254 nm for standard of sulfur (saturated solution of elemental sulfur)

| Technika (Technique) | Rozpuszczalnik (Solvent) | a | b | R_f | k | R_m |
|----------------------|--------------------------|------|-----|-------|-------|-------|
| NP-TLC | DCM | 3,95 | 5 | 0,79 | 0,27 | -0,56 |
| | MTBE | 3,51 | | 0,70 | 0,43 | -0,84 |
| | nC6 | 3,00 | | 0,60 | 0,67 | -0,41 |
| | nC6+5% MTBE | 3,45 | | 0,69 | 0,45 | -0,80 |
| | MTBE+0,25% IzOH | 2,81 | | 0,56 | 0,79 | -0,24 |
| RP-TLC | DCM | 4,29 | 5,5 | 0,78 | 0,28 | -1,27 |
| | nC6 | 5,20 | 8 | 0,65 | 0,54 | -0,61 |
| | DCM + 0,25% IzOH | 7,48 | | 0,94 | 0,064 | -1,19 |
| | nC6 + 0,25% IzOH | 5,21 | | 0,65 | 0,54 | -0,28 |
| | nC6 + 1% IzOH | 5,44 | | 0,68 | 0,47 | -0,33 |
| | THF | 6,48 | | 0,81 | 0,24 | -0,62 |
| | THF+ 0,25% IzOH | 6,48 | | 0,81 | 0,24 | -0,62 |
| | THF+ 1% IzOH | 6,08 | | 0,76 | 0,32 | -0,49 |
| | ACCN | 1,28 | | 0,16 | 5,25 | 1,66 |
| | ACCN + 1% IzOH | 2,32 | | 0,29 | 2,45 | 0,89 |
| | Aceton | 3,12 | | 0,39 | 1,56 | 0,19 |
| | Aceton+0,25%IzOH | 3,84 | | 0,48 | 1,08 | 0,03 |
| | nC6 + 5% MTBE | 4,00 | | 0,50 | 1 | 0 |
| | MTBE | 5,04 | | 0,63 | 0,59 | -0,53 |
| | MTBE+0,25% IzOH | 5,44 | | 0,68 | 0,47 | -0,75 |
| MTBE+5% IzOH | 6,80 | 0,85 | | 0,18 | -1,73 | |

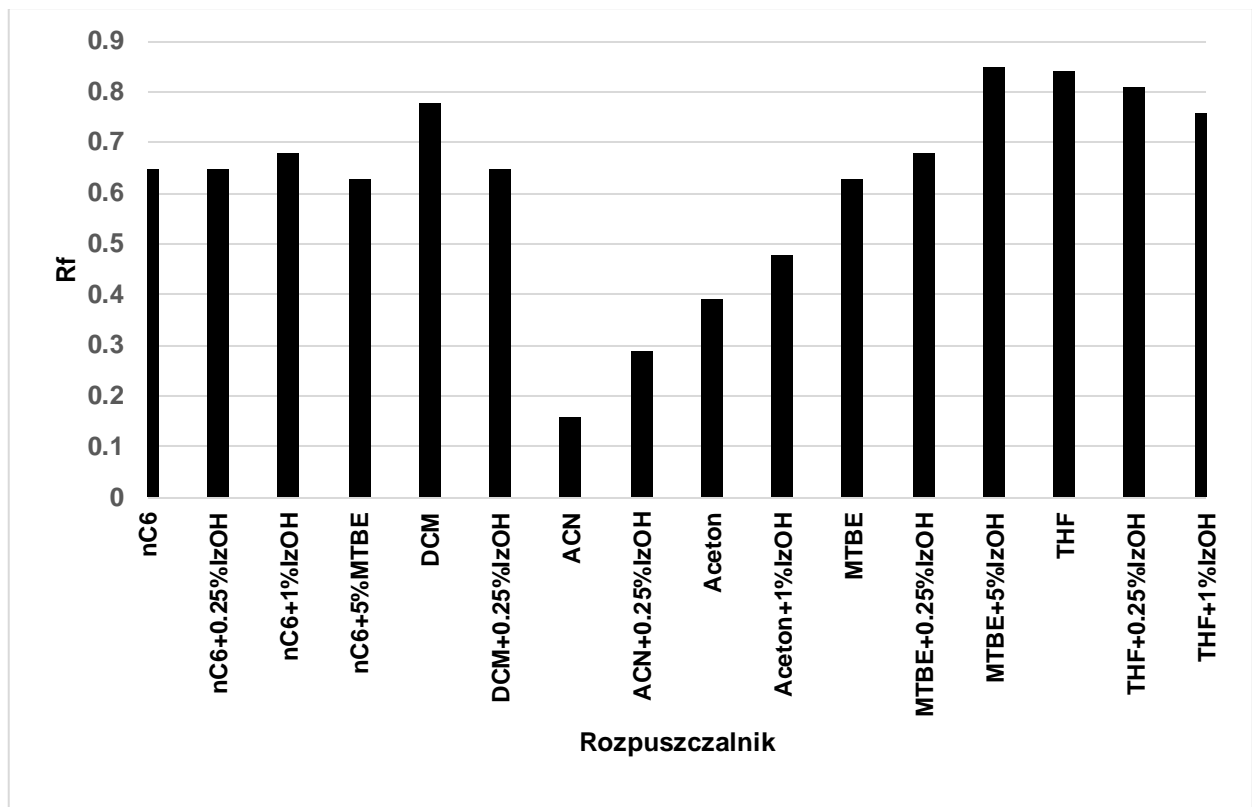
Do faz ruchomych, które po dodaniu dodatku (w postaci niewielkiej ilości izopropanolu lub MTBE, od 0,25-5 %) współczynnik R_f wzrósł należą:

- nC6 z dodatkiem IzOH (RP-TLC),
- ACN z dodatkiem IzOH (RP-TLC),
- Aceton z dodatkiem IzOH (RP-TLC),
- MTBE z dodatkiem IzOH (RP-TLC),
- nC6 z dodatkiem MTBE (NP-TLC),
- DCM z dodatkiem IzOH (RP-TLC),

Natomiast do faz ruchomych, w których współczynnik R_f maleje po dodaniu dodatku należą:

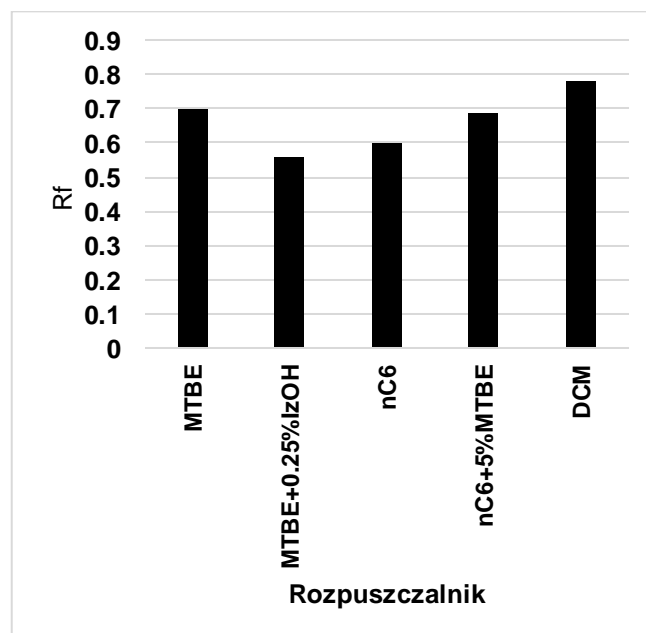
- nC6 z dodatkiem MTBE (RP-TLC),
- THF z dodatkiem IzOH (RP-TLC),
- MTBE z dodatkiem IzOH (NP-TLC).

Porównanie wszystkich wartości R_f dla wszystkich przygotowanych faz ruchomych przedstawiono na rysunku nr 2 i 3.



Rys. 2. Wartości współczynnika Rf dla rozpuszczalników – RP-TLC

Fig. 2. The values of Rf factor for solvents – RP-TLC



Rys. 3. Wartości współczynnika Rf dla rozpuszczalników – NP-TLC

Fig. 3. The values of Rf factor for solvents – NP-TLC

Dla analizy techniką TLC wyznaczono również przyrost względny (dla używania fazy ruchomej bez oraz z dodatkiem). Wykorzystano do tego wzór poniżej (1). Natomiast wyniki obliczeń przedstawione zostały w tabeli 7 i 8.

Przyrost względny:

$$P_w = \Delta k / k_{bd} \quad (1)$$

gdzie:

 P_w – przyrost względny Δk – różnica między wartością k dla czystego eluentu i wartością k dla eluentu z dodatkiem (w zależności od przyrostu mniejsza liczba odejmowana od większej) k_{bd} – wartość k dla czystego eluentu (bez dodatku)

Tabela 7. Przyrost względny dla badania techniką RP-TLC

Table 7. Relative increase for examination by RP-TLC technique

| Faza ruchoma (<i>Mobile phase</i>) | R_f | k | Względny przyrost (<i>The relative growth</i>) |
|--------------------------------------|-------|------|---|
| nC6 | 0,65 | 0,54 | - |
| nC6 + 0,25 % IzOH | 0,65 | 0,54 | 0 |
| nC6 + 1 % IzOH | 0,68 | 0,47 | -0,13 |
| nC6+5%MTBE | 0,63 | 0,59 | 0,09 |
| DCM | 0,78 | 0,28 | - |
| DCM + 0,25 % IzOH | 0,65 | 0,54 | 0,93 |
| THF | 0,84 | 0,19 | - |
| THF + 0,25 % IzOH | 0,81 | 0,23 | 0,21 |
| THF + 1 % IzOH | 0,76 | 0,32 | 0,68 |
| ACN | 0,16 | 5,25 | - |
| ACN + 1 % IzOH | 0,29 | 2,45 | -0,53 |
| Aceton | 0,39 | 1,56 | - |
| Aceton + 0,25 % IzOH | 0,48 | 1,08 | 0,31 |
| MTBE | 0,63 | 0,59 | - |
| MTBE + 0,25 % IzOH | 0,68 | 0,47 | 0,20 |
| MTBE + 5 % IzOH | 0,85 | 0,20 | 0,66 |

Tabela 8. Przyrost względny dla badania techniką NP-TLC

Table 8. Relative increase for examination by NP-TLC technique

| Faza ruchoma (<i>Mobile phase</i>) | R_f | k | Względny przyrost (<i>The relative growth</i>) |
|--------------------------------------|-------|------|---|
| nC6 | 0,60 | 0,67 | - |
| nC6 + 5 % MTBE | 0,69 | 0,45 | 0,33 |
| MTBE | 0,70 | 0,43 | - |
| MTBE+0,25%IzOH | 0,56 | 0,79 | -0,84 |

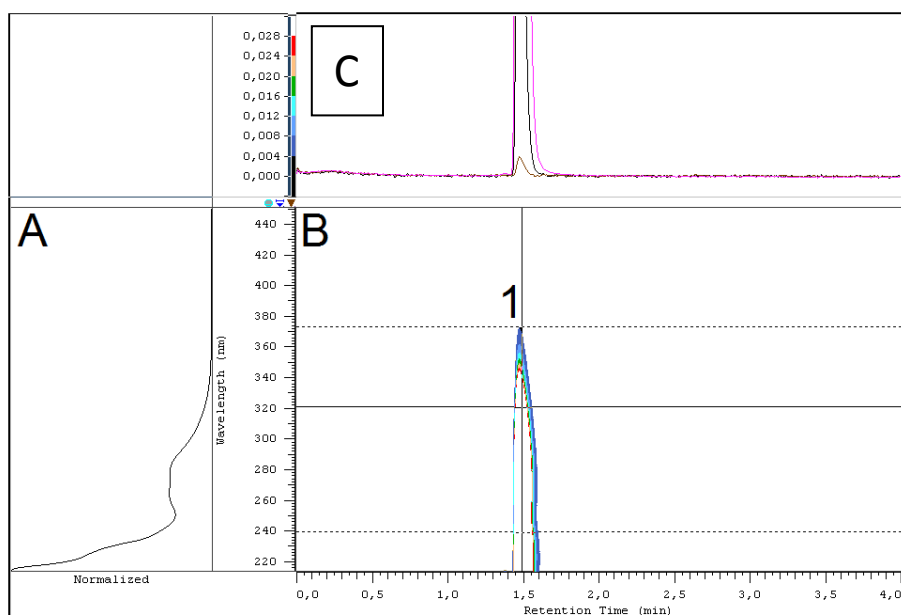
3.2. Wyniki – identyfikacja siarki w próbkach gleby techniką HPLC (Results - identification of sulfur in the soil samples by HPLC technique)

Na rys. 4 zamieszczono typowe chromatogramy detektora UV-VIS-DAD, otrzymane dla mieszaniny wzorcowej siarki elementarnej eluowanej n-heksanem w warunkach NP-HPLC na żelu krzemionkowym, rys. 5a-f zamieszczono przykłady chromatogramów, otrzymanych w warunkach NP-HPLC, z n-heksanem, jako eluentem. Na rys. 6a-c odpowiednio chromatogramy dla kolumny C18. Widać, że wzorzec siarki daje tylko jeden pik, natomiast w przypadku ekstraktów gleb, pojawia się większa ilość pików, która odpowiada za zanieczyszczenia gleby w postaci węglowodorów aromatycznych. Obie techniki wykazały, iż elementarna siarka znajduje się w znacznych ilościach w glebie pobranej z terenów Zakładów Chemicznych oraz terenu Lotos Lab, które również wykazują obecność innych zanieczyszczeń-węglowodorów.

Tabela 9. Czasy retencji oraz współczynniki retencji wyznaczone dla wzorca siarki (roztwór nasycony siarki elementarnej)

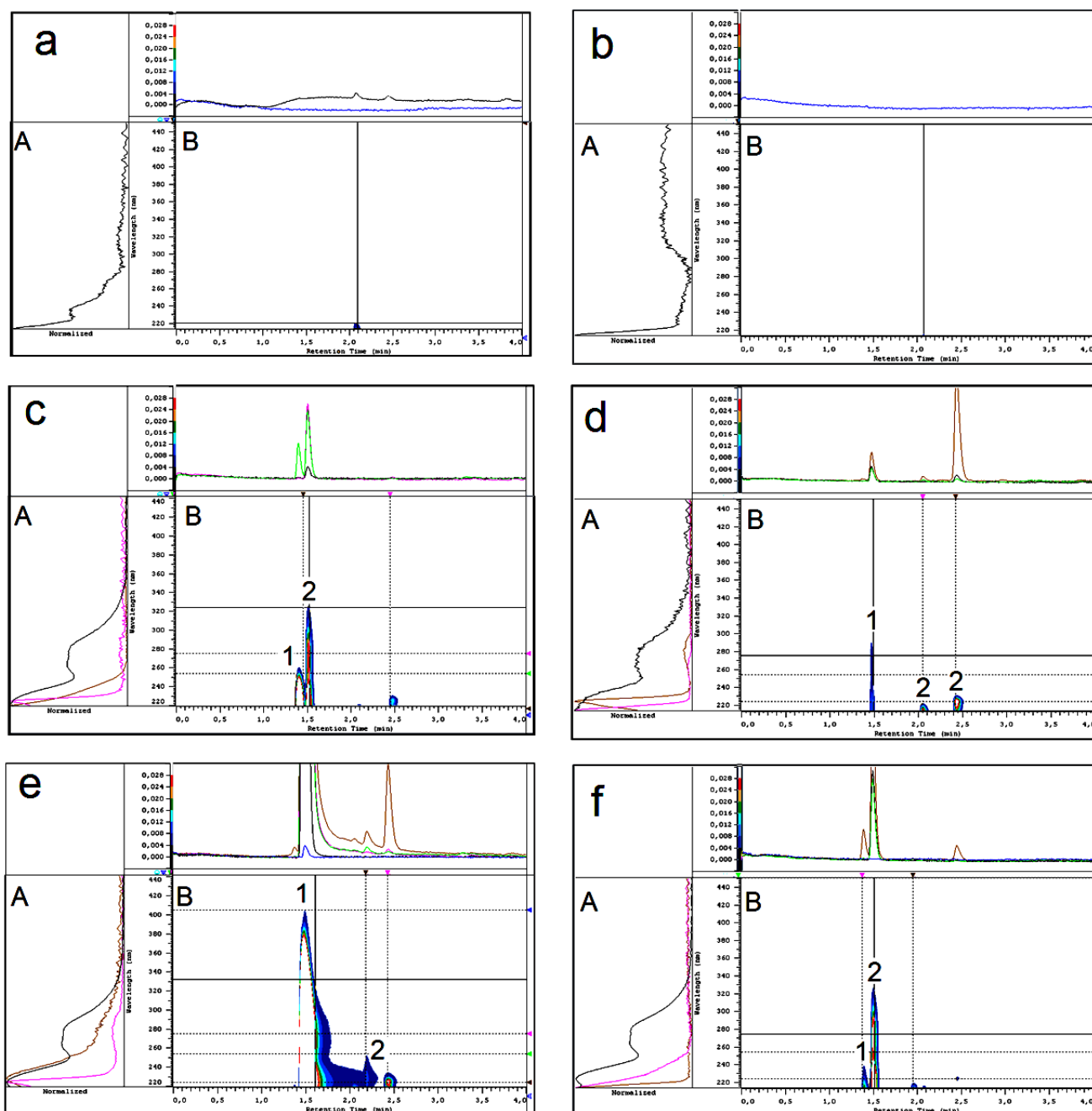
Table 9. The retention times and the retention factors determined for standard of sulfur (saturated solution of elemental sulfur)

| Technika (Technique) | Faza ruchoma (Mobile phase) | t_R [min] | k (dla $t_0=0,97$ min) (x0,62) | k (dla $t_0=1,18$ min) (x0,75) | k (dla $t_0=1,26$ min) (x0,80) | k (dla $t_0=1,46$ min) |
|----------------------|-----------------------------|-------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| NP-HPLC | nC6 | 1,55 | 0,60 | 0,31 | 0,23 | 0,06 |
| RP-HPLC | nC6 | 1,49 | 0,16 | 0 | -0,10 | 0,02 |
| | DCM | 1,22 | -0,05 | -0,22 | -0,27 | -0,16 |
| | ACCN | 5,96 | 3,62 | 2,82 | 2,59 | 3,08 |
| | ACCN+1%IzOH | 6,26 | 3,85 | 3,01 | 2,77 | 3,29 |
| | Aceton | 2,63 | 1,04 | 0,69 | 0,58 | 0,80 |
| | Aceton+0,25%IzOH | 2,60 | 1,02 | 0,67 | 0,57 | 0,78 |



Rys. 4. Chromatogram wzorca siarki (25 μ l 0,20 mg siarki elementarnej ekstrahowana w nC6, przepływ 2 ml/min, kolumna Kolumna Macherey-Nagel HPLC o wymiarach 250 x 4 mm, pakowana z Nucleosil SiO₂, 100Å, 3 μ m (Niemcy), faza ruchoma: nC6, detekcja UV-VIS-DAD, A-Widmo, B- chromatogram UV-VIS/DAD, piki: 1- S₈; C – nałożone piki chromatograficzne, dla 240, 320, 374 nm.

Fig. 4. Chromatogram of standard of sulfur (25 μ l 0,20 mg of elemental sulfur dissolved in nC6, flow of 2 ml / min, Column Macherey-Nagel HPLC with dimensions 250 x 4 mm, packed with Nucleosil SiO₂, 100Å, 3 microns (Germany) mobile phase: nC6, detection UV-VIS-DAD A-spectrum, B- chromatogram UV-VIS / DAD, peaks: 1- S₈, C- imposed chromatographic peaks for 240, 320, 374 nm.

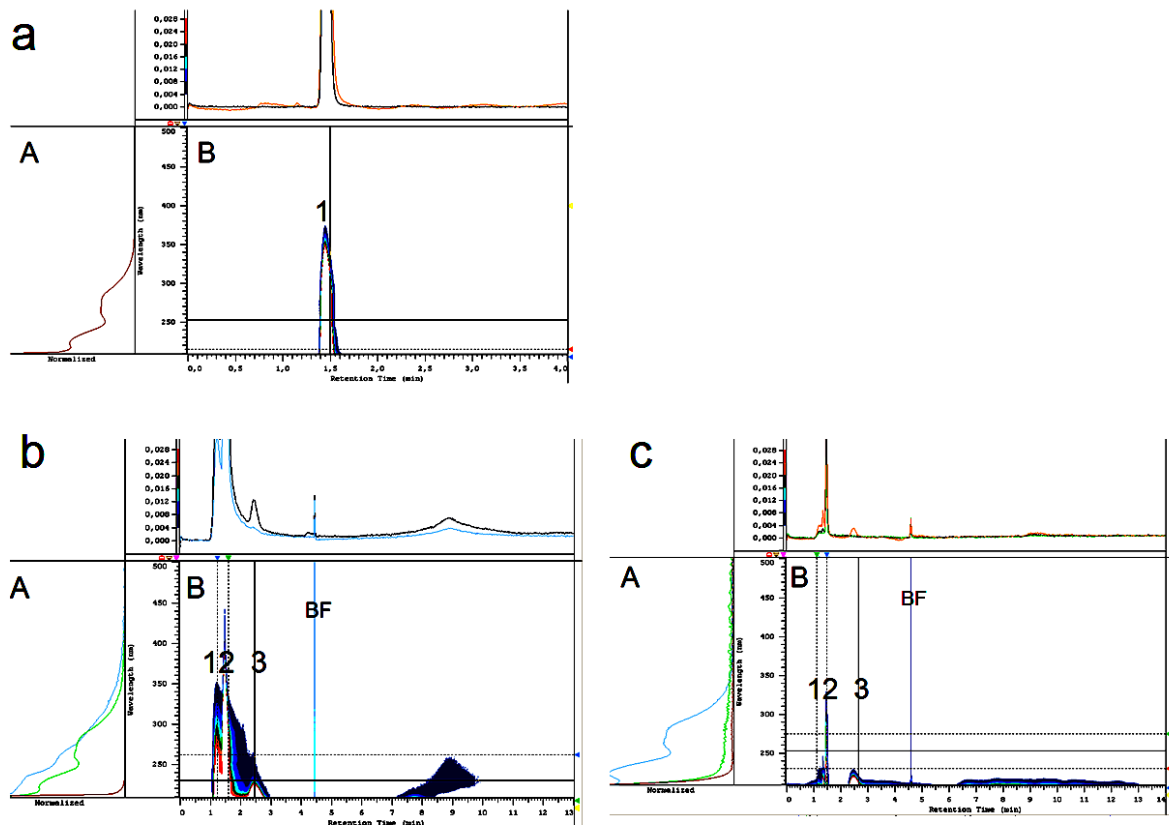


Rys. 5. Chromatogramy dla warunków NP-HPLC; przepływ: 2 ml/min, kolumna Kolumna Macherey-Nagel HPLC o wymiarach 250 x 4 mm, pakowana z Nucleosil SiO₂, 100Å, 3 µm (Niemcy), faza ruchoma: nC6, detekcja UV-VIS-DAD, A-Widmo, B-UV-VIS/DAD, objętość dozowania 25 µl:

- 1 g gleby pobrany z okolic Politechniki Gdańskiej ekstrahowany w 3 ml nC6 (próbka pobrana na głębokości 5 cm),
- 1 g gleby pobrany z okolic Politechniki Gdańskiej ekstrahowany w 3 ml nC6 (próbka pobrana na głębokości 30 cm),
- 1 g gleby pobrany z okolic Rafinerii Gdańskiej – Lotos Lab. ekstrahowany w 3 ml nC6 (próbka pobrana na głębokości 5 cm), (Piki: 1-węglowodory, 2-S₈),
- 1 g gleby pobrany z okolic Rafinerii Gdańskiej – Lotos Lab. ekstrahowany w 3 ml nC6 (próbka pobrana na głębokości 30 cm), (Piki: 1-węglowodory, 2-S₈),
- 1 g gleby pobrany z okolic Zakładu Chemicznego ekstrahowany w 3 ml nC6 (próbka pobrana na głębokości 5 cm), (Piki: 1-węglowodory, 2-S₈),
- 1 g gleby pobrany z okolic Zakładu Chemicznego ekstrahowany w 3 ml nC6 (próbka pobrana na głębokości 30 cm). (Piki: 1-węglowodory, 2-S₈).

Fig. 5. The chromatograms conditions for NP-HPLC; flow rate: 2 ml / min column column Macherey-Nagel HPLC with dimensions 250 x 4 mm, packed with Nucleosil SiO₂, 100Å, 3 microns (Germany), mobile phase: NC6, detection UV-VIS-DAD, A-spectrum, B-UV-VIS / DAD, dosage volume of 25 µl:

- 1 g soil taken from the vicinity of the Technical University of Gdansk extracted in 3 ml of nC6 (sample taken at a depth of 5 cm),
- 1 g soil taken from the vicinity of the Technical University of Gdansk extracted in 3 ml of nC6 (sample taken at a depth of 30 cm),
- 1 g soil taken from the vicinity of Gdansk Refinery - Lotos Lab. extracted in 3 ml of nC6 (a sample taken at a depth of 5 cm) (Peaks: 1-hydrocarbons, 2-S₈),
- 1 g soil downloaded from the vicinity of Gdansk Refinery - Lotos Lab. extracted in 3 ml of nC6 (sample taken 30 cm) (Peaks: 1-hydrocarbons, 2-S₈),
- 1 g of soil taken from the area of the Department of Chemical extracted in 3 ml of nC6 (sample taken at a depth of 5 cm) (Peaks: 1-hydrocarbons, 2-S₈),
- 1 g of soil taken from the area of the Department of Chemical extracted in 3 ml of nC6 (sample taken at a depth of 30 cm). (Peaks: 1-hydrocarbons, 2-S₈).



Rys. 6. Chromatogramy dla warunków RP-HPLC; przepływ: 2 ml/mi, kolumna: Kolumna Symmetry C18, 100Å, 5 µm, o wymiarach 4,6 mm x 250 mm, (Waters, USA), faza ruchoma: nC6, detekcja UV-VIS-DAD, A-Widmo, B-UV-VIS/DAD, objętość dozowania 25 µl :

- 0,20 mg siarki elementarnej ekstrahowana w nC6,
- 1 g gleby pobrany z okolic Zakładu Chemicznego ekstrahowany w 3 ml nC6 (próbka pobrana na głębokości 5 cm) (Piki:1-mikropyłygleby, 2- S₈, 3-węglowodory). BF- przepływ zwrotny,
- 1 g gleby pobrany z okolic Zakładu Chemicznego ekstrahowany w 3 ml nC6 (próbka pobrana na głębokości 30 cm) (Piki:1-mikropyłygleby, 2- S₈, 3-węglowodory). BF- przepływ zwrotny.

Fig. 6. chromatograms for the conditions of RP-HPLC; flow rate: 2 ml / ml; column: Symmetry C18, 100Å, 5 µm, 4,6 mm x 250 mm, (Waters, USA), mobile phase: NC6, detection UV-VIS-DAD, A-spectrum, B-UV -VIS / DAD, dosage volume of 25 µl:

- 0.20 mg of elemental sulfur in nC6 extracted,
- 1 g of soil taken from the area of the Department of Chemical extracted in 3 ml of nC6 (sample taken at a depth of 5 cm) (Peaks 1-microdust of soil, 2-S₈, 3-hydrocarbons). BF- backflow,
- 1 g of soil taken from the area of the Department of Chemical extracted in 3 ml nC6 (sample taken at a depth of 30 cm) (Peaks 1-microdust of soil, 2-S₈, 3-hydrocarbons). BF- backflow.

4. Dyskusja (Discussion)

Dobór warunków ekstrakcji - ługowania siarki elementarnej i innych nisko polarnych składników gleby oraz warunków elucji - optymalnym ekstrahentem do badań z zastosowaniem HPLC, tak z polarnym sorbentem typu „SiO₂” żel krzemionkowy, czy z sorbentem niepolarnym typu C18 lub podobnym, powinien spełniać kilka warunków:

- powinien być względnie dobrym rozpuszczalnikiem siarki i tych innych składników gleby, które mają być identyfikowane i oznaczane;
- by możliwa była identyfikacja siarki na podstawie przebiegu jej widma UV-VIS – Rys.1;
- powinien nie absorbować światła UV w zakresie najkorzystniej od 200-400 nm;
- powinien posiadać taką samą lub niższą siłę elucyjną niż eluent, a w przypadku stosowania elucji gradientowej niż początkowy eluent programu elucji, a najkorzystniej być eluentem i lub posiadać skład początkowego etapu programu elucji;
- w warunkach normalnych układów faz (NP-HPLC) oraz polarnego sorbentu jako wypełnienia kolumny, eluent zapewniający retencję bardzo nisko polarnej siarki powinien być nisko polarny, a sorbent o możliwie wysokiej polarności, taki jak, żel krzemionkowy, NH₂, czy tlenku glinu, albo inny;
- w warunkach chromatografii, adsorbcyjnej z kolumną do odwróconych układów faz typu C18, czy phenyl lub bi-phenyl, eluent z pewnością nie może zawierać wady, ani prostych alkoholi, w których siarka jest całkowicie nierozpuszczalna. Jednocześnie elucja wysoce hydrofobowej siarki wymaga także względnie nisko polarnego eluentu.

W praktyce, tak w warunkach NP, jak i z fazą stacjonarną C18, eluent w warunkach izokratycznych, początkowy etap programu elucji powinien być odpowiednio: cieczą nisko, lub względnie nisko polarną. Dla elucji siarki, potencjalnymi eluentami lub składnikami eluentu, które powinny w dużych zawartościach stanowić eluent, lub być jednymi jego składnikami, są alkanany, cykloalkany, chloro-alkany, estry alifatyczne i ewentualnie estry typu octan etylu, lub propylu.

W niniejszych badaniach – doświadczalnie ustalono, że rozpuszczalność siarki w nC6 w temp. pokojowej wynosi około 0,20 mg/ml. W warunkach NP zastosowano żel krzemionkowy jako fazę stacjonarną oraz n-heksan albo eter metylowo-tertbutylowy (MTBE) jako eluent, dozując za każdym razem roztwory wzorców i ekstrakty gleby jako roztwory w n-heksanie (pkt. 2.4.1.).

Natomiast, z zastosowaniem sorbentu niepolarnego typu C18 w badaniach uwzględniono jako eluenty: n-heksan, MTBE, dichlorometan (DCM), acetonitryl (ACCN), ACCN+1% izopropanolu (IzOH), aceton oraz aceton+0,25%IzOH (tabela nr 8), dozując za każdym razem roztwory wzorcowe i ekstrakty gleby w danym eluencie jako rozpuszczalniku, stosowano wyłącznie elucję izokratyczną.

W celu elucji z kolumny składników gleby o podwyższonym powinowactwie do fazy stacjonarnej zamiast elucji gradientowej lub blokowej zmiany siły elucji zastosowano przepływ zwrotny eluentu w kolumnie, tak w kolumnie typu żel krzemionkowy jak i w typu C18.

1. Aby podnieść granicę detekcji oraz precyzję oznaczania obecności oraz zawartości siarki metodą TLC należałoby zwiększyć dozowaną próbkę z 5 do 50 µL za pomocą automatycznego dozowania, w celu uzyskania jednej wielkości plamek (dozowanie manualne przy takiej ilości dozowanej może to wykluczyć i obniżyć precyzję badania).
2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa kolumnowa w normalnym układzie faz odnajduje również zastosowanie w oznaczaniu obecności oraz zawartości siarki elementarnej w próbkach gleby. Optymalnymi warunkami chromatograficznymi dla analizy techniką NP-HPLC są n-heksan jako faza ruchoma, przepływ 2 mL/min, 25 µL dozowanej próbki oraz kolumna z Nucleosil SiO₂ 100 3 µm (Niemcy), przy detekcji RID oraz UV-VIS/DAD.
3. Aby podnieść granicę detekcji NP-HPLC UV-VIS/DAD należy zastosować metodę dodatku wzorca wewnętrznego.
4. Każde z zastosowanych w badaniach warunków chromatograficznych (NP, RP) są przydatne do "analizy", gdy gleba nie zawiera "kontaminantów" nisko polarnych - z ropy naftowej lub węgla. Gdy zawiera - piki niektórych składników / grup składników nakładają się na pik siarki, a gdy - dodatkowo - zawartość siarki jest niska, albo tylko śladowa, to studia i badania wykazały, że zastosowanie do tych badań detektora typu DAD jest bardzo ważne, ponieważ dodatkowo zapewnia "identyfikację" siarki na podstawie charakterystycznego dla niej widma w zakresie UV – rys. 1.
5. Detekcja RID, jest przydatna w analizach tylko w przypadku znacznych stężeń siarki w glebie, do tego nie umożliwia uzyskania dodatkowej informacji - widma, i identyfikacja jest możliwa tylko na podstawie wartości "k".
6. Otwartym problemem badawczym pozostaje przygotowanie próbek do analizy.

5. Wnioski (Conclusions)

1. Technika TLC może znaleźć zastosowanie do identyfikacji oraz oznaczania zawartości siarki elementarnej w glebie jako „pół-ilościowa” metoda przesiewowa, obniżając czas i koszt badań. Wynika to z względnie wysokich poziomów LOD / LOQ oraz niewielkiej precyzji.
2. Na podstawie badań wykazano, że najbardziej korzystne warunki identyfikacji i oznaczania siarki rodzimej w glebach mogących jednocześnie zawierać nisko i średnio polarne zanieczyszczenia pochodzenia naftowego oraz po-węglowego, jest ekstrakcja / ługowanie rozpuszczalnikiem alifatycznym, np. n-heksanem oraz wykorzystanie NP-HPLC/UV-VIS-DAD /RID do rozdzielania od innych składników matrycy analitycznej, identyfikacji oraz oznaczania siarki elementarnej. W razie takiej potrzeby opracowana metodyka umożliwia identyfikację określonych składników oraz oznaczenie orientacyjnej zawartości nisko i średnio polarnych zanieczyszczeń gleby.
3. Siarka jest "mikroelementem" dla niektórych roślin uprawnych, a szczególnie – fungicydem i coraz częściej bywa w tym ostatniej funkcji stosowana. Niniejsza praca ma więc znaczenie dla rolnictwa. Opracowanie i walidacja tego typu procedury analitycznej wymaga jeszcze dalszych badań.

1. *The TLC technique can be used for identification and determination of elemental sulfur in the soil as "semi-quantitative" method of screening, reducing the time and cost of testing. This is due to the relatively high levels of LOD / LOQ small and precise.*
2. *Studies have shown that the most favorable conditions for the identification and determination of native sulfur in soils, which may also include low- and medium-polar impurities from petroleum-carbon is the extraction / leaching of the aliphatic solvent, such as N-hexane, and the use of NP-HPLC / VIS-UV-DAD / RID separation from other matrix analysis components, for identification and determination of elemental sulfur. If necessary, this developed methodology enables the identification of specific components and the determination of the orientation content low and medium polar soil contamination.*
3. *Sulfur is "micronutrient" for some crops, particularly - a fungicide and is increasingly used in this last function. This work is significant for agriculture. Development and validation of this type of analytical procedure still requires further research.*

6. Literatura (Literature)

1. A. S. Modaihsh, W. A. Al-Mustafa, A. I. Metwally, *Effect of elemental sulphur on chemical changes and nutrient availability in calcareous soils*, Plant and Soil, Vol. 116, 1989.
2. T. Bereda, „Siarka”, „Sulphur”, Państwowy Instytut Geologiczny, 2010.
3. A. Gąsiewicz, M. Jasionowski, A. Poberzhskyy, „Wpływ eksploatacji na cechy geochemiczne środowiska powierzchniowego złóż siarki z pogranicza polsko-ukraińskiego”, *The impact of exploitation on the geochemical features of the environment of Surface deposits of sulfur from the border of Polish-Ukrainian*, Biuletyn Państwowego Instytutu Geologicznego 449, 2012.
4. E. Gutman, K. Kwiecień, „Polska Siarka”, *Polish Sulphur*, Zakład Wyd.-Usług. Adam Konieczny, Warszawa, 1992.
5. T. Fernandes, *Guidelines for Landfill Disposal of Sulfur Waste and Remediation of Sulfur Containing Soils*, Alberta Environment, 2011.
6. A. Bellok, E. Górecka, A. Kryza, M. Szuwarzyński, „Wpływ zakładów przemysłowych na rozmieszczenie metali ciężkich w glebach i podglebiu obszaru Trzebinia-Chrzanów”, *The impact of industrial plants on the distribution of heavy metals in the soil and subsoil area of Trzebinia-Chrzanów*, Przegląd Geologiczny, Tom 45, Nr 5, 1997.
7. A. S. Modaihsh, W. A. Al-Mustafa, A. I. Metwally, *Effect of elemental sulphur on chemical changes and nutrient availability in calcareous soils*, Plant and Soil, Vol. 116, 1989.
8. G. Kulczycki, „Wpływ nawożenia siarką elementarną na zawartość mikroelementów w roślinach i glebach”, *Effect of fertilization by elemental sulfur on the content of micronutrients in plants and soils*, Katedra Żywnienia Roślin, Roślin, Akademia Rolnicze we Wrocławiu, Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, Zeszyt 502, 2004.
9. C. Yu-Wei, H. A. Joly, N. Belzile, *Determination of elemental sulfur in environmental samples by gas chromatography-mass spectrometry*, Chemical Geology, Vol. 137, 1997.
10. J. K. Bartlett, D. A. Skoog, *Colorimetric Determination of Elemental Sulfur in Hydrocarbons*, Analytical Chemistry, Vol. 26, No. 6, 1954.

11. J. H. Watkinson, A. Lee, D. R. Lauren, *Measurement of elemental sulfur in soil and sediments - Field sampling, sample storage, pretreatment, extraction and analysis by high performance liquid chromatography*, Australian Journal of Soil Research, Vol. 25 No. 2, 1987.
12. D. G. Maynard, P. A. Addison, *Extraction and colorimetric determination of elemental sulfur in organic horizons of forest soils*, Canadian Journal of Soil Science, Vol. 65, 1985.
13. K. Bielecki, G. Kulczycki, „Modyfikacja metody Buttersai Chenery’ego oznaczanie siarki ogólnej w roślinach i glebie”, *The modified method of Butters and Chenery’ego determination of total sulfur in plants and soil*, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Przemysł Chemiczny 91/5, 2012.
14. *Development and validation of analytical methods for elemental sulfur in Alberta soils*, Maxxam Analytics, Government of Alberta, 2015.
15. G. Gryglewicz, S. Gryglewicz, *Determination of elemental sulfur in coal by gas chromatography-mass spectrometry*, Fresenius Journal of Analytical Chemistry, Vol.370, 2001.
16. K. Kuklińska, M. Cieszyńska, L. Wolska, J. Namieśnik, *Analytical and bioanalytical problems associated with the toxicity of element al sulfur*, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 48, 2013.
17. W. Puacz, W. Szahun, J. Siepak, T. Sobczyński, *Determination of Selected Sulphur Speciation Forms in Fresh Water Lakes and Bottom*, Poznań, Polish Journal of Environmental Studies, vol. 10, No. 5, 2001.
18. D. G. Maynard, P. A. Addison, *Extraction and colorimetric determination of elemental sulfur in organic horizons of forest soils*, Canadian Journal of Soil Science, Vol. 65, 1985.
19. K. Boratyński, A. Grom, M. Ziętek, „Badania nad zawartością siarki w glebie”, *Research on sulfur kontent in soil*, Roczniki Gleboznawcze T. XXVI, Z. 3, Warszawa, 1975.
20. J. J. Richard, R. D. Vick, G. A. Junk, *Determination of elemental sulfur by gas chromatography*, Environmental Science and Technology, Vol. 11, No. 12, 1977.
21. J. Namieśnik, J. Łukasiak, Z. Jamrógiewicz, „Pobieranie próbek środowiskowych do analizy”, *Environmental sampling for analysis*, PWN, Warszawa, 1995.
22. M. Bamberg, *Gmelin Handbuch der Anorganischen Chemie*, Schwefel, Teil A, Lieferung 3, VCH, Weinheim, 1953, Dissertation, Univ. Saarbrücken, 1959.