

Patrycja MAKOŚ, Grzegorz BOCZKAJ*

Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej,
Wydział Chemiczny Politechnika Gdańska,
ul. Gabriela Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk,
*Autor do korespondencji, e-mail: grzegorz.boczka@gmail.com

Chemometryczne podejście do optymalizacji dyspersyjnej mikroekstrakcji w układzie ciecz-ciecz (DLLME), jako metody przygotowania próbek do rozdzielania i oznaczania krezoli w ściekach rafineryjnych.

Streszczenie: W pracy przedstawiono procedurę optymalizacji dyspersyjnej mikroekstrakcji w układzie ciecz-ciecz (DLLME), z zastosowaniem frakcyjnych planów czynnikowych tj. planu Placketta-Burman'a oraz centralnego planu kompozycyjnego. Zdefiniowano parametry mające istotny wpływ na efektywność ekstrakcji krezoli i dla nich przeprowadzono procedurę optymalizacyjną, w wyniku której wyznaczono wartości optymalne parametrów w tym pH 6 oraz objętość rozpuszczalnika dyspergującego wynoszącą 0,4 mL.

Słowa kluczowe: dyspersyjna mikroekstrakcja w układzie ciecz-ciecz, frakcyjne plany czynnikowe, chromatografia gazowa, krezole, ścieki rafineryjne

Chemometric approach to the optimization of dispersive liquid-liquid microextraction for the separation and determination of cresols in refinery wastewater.

Abstract: This paper present the procedure to optimize dispersive liquid-liquid micro-extraction (DLLME), using fractional factorial plans i.e. Plackett-Burman design and central composite design. The parameters affecting the efficiency of extraction were determined and for them the optimum conditions were established, by which determined the optimum values of parameters including pH 6 and volume of disperser solvent equal 0,4 mL.

Key words: dispersive liquid-liquid micro-extraction, fractional factorial plans, gas chromatography, cresols, refinery wastewater

1. Wstęp (Introduction)

Krezole klasyfikuje się jako substancje toksyczne i żrące, będące promotorami procesu nowotworowego. Wpływają również negatywnie na układ nerwowy, oddechowy, błony śluzowe i nerki. Do środowiska naturalnego przedostają się w wyniku działalności przemysłu koksowniczego, odlewniczego, chemicznego, a także rafineryjnego [1-2]. W wyniku procesów przetwórstwa ropy naftowej powstają znaczne ilości toksycznych ścieków, których skład różni się w zależności od pochodzenia surowca oraz stosowanych procesów technologicznych. Przeciętnie tego typu ścieki zawierają od 20 do 200 mg/L fenoli [3]. Z uwagi na ich wysoką toksyczność, wprowadzono ograniczenia zawartości fenoli w ściekach przemysłowych zrzucanych do zbiorników wodnych. Ich dopuszczalne stężenie wynosi 1 mg/L [4], dlatego konieczna jest ciągłe monitorowanie ich zawartości w ściekach przed i po oczyszczeniu.

W celu oznaczania izomerów krezolu wykorzystuje się szereg technik analitycznych, w tym w głównej mierze technikę chromatografii gazowej w połączeniu z detektorami uniwersalnymi jak i selektywnymi [5-7]. Związki te z uwagi na swoje specyficzne właściwości, a także występowanie często w niskich stężeniach w próbkach charakteryzujących się skomplikowaną matrycą, wymagają zastosowania odpowiednich metod przygotowania próbek. W tym celu stosuje się różne typy ekstrakcji, w tym ekstrakcję w układzie ciecz-gaz do których zaliczane są techniki dynamicznej analizy fazy nadpowierzchniowej i statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej, ekstrakcje w układzie ciecz-ciało stałe, w tym technikę ekstrakcji do fazy stałej [8], mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej. Do technik ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz zaliczane są klasyczna ekstrakcja ciecz-ciecz, mikroekstrakcja ciecz-ciecz, mikroekstrakcja do pojedynczej kropli [9], a także jedna z nowszych technik – dyspersyjna mikroekstrakcja w układzie ciecz-ciecz (DLLME). Jest to technika opracowana w 2006 roku przez Raza'e'a [10]. DLLME polega na dodaniu do próbki rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, a także dyspergującego, który ma za zadanie rozbicie na drobne kropelki rozpuszczalnika ekstrakcyjnego. Taką mieszaninę wytrząsa się, a następnie odwirowuje i pobiera fazę sedymentacyjną.

W celu wyznaczenia optymalnych warunków ekstrakcji, coraz częściej wykorzystuje się plany czynnikowe, które umożliwiają jednoczesne określenie oddziaływań wielu niezależnych zmiennych [11-13]. Pozwalają one na wyodrębnienie czynników mających rzeczywisty wpływ na dany proces, a także określenie ich wzajemnych oddziaływań. Badanie wpływu wielu zmiennych niesie ze sobą konsekwencję wzrostu ilości doświadczeń. Przykładowo badając siedem zmiennych należałoby przeprowadzić aż 128 analiz. Dlatego w celu przebadania większej ilości czynników mających potencjalny wpływ na efekt danego procesu, wykorzystuje się tzw. frakcyjne plany czynnikowe. Jednym z przykładów jest tzw. plan Placketta-Burman'a [14], który poprzez wyeliminowanie dużej części kombinacji pozwala zbadać wpływ wielu czynników przy stosunkowo niewielkiej ilości eksperymentów. Plan ten zakłada możliwość oceny wpływu $k = N - 1$ zmiennych, przy przeprowadzeniu N doświadczeń (N jest zawsze wielokrotnością 4). Ocena wpływu danej zmiennej określa się poprzez porównanie średniej arytmetycznej odpowiedzi uzyskanych dla procesów zrealizowanych pod wpływem niskiego poziomu czynnika do średniej arytmetycznej odpowiedzi procesów wykonanych z zastosowaniem czynników w wysokim poziomie. Jest to plan, który umożliwia wyeliminowanie czynników nie mających istotnego wpływu na warunki danego procesu, jednak nie dostarcza wiarygodnej informacji o oddziaływaniu pomiędzy zmiennymi. Aby uzyskać tego typu informację należy rozszerzyć badania o zastosowanie innych planów czynnikowych tzn. centralnego planu kompozycyjnego, czyli planów który zakłada wyznaczenie nie tylko najniższych i najwyższych wartości danej zmiennej ale także punktów centralnych, przy większej ilości kombinacji. Oceny dokonuje się na podstawie utworzonej 3-wymiarowej powierzchni odpowiedzi [15].

W pracy przedstawiono procedurę doboru warunków techniki dyspersyjnej mikroekstrakcji w układzie ciecz-ciecz do oznaczania o-krezolu i m-krezolu w ściekach przemysłowych, z zastosowaniem modelu Placketta-Burman'a i centralnego planu kompozycyjnego.

2. Część eksperymentalna (Experimental)

2.1. Materiały (Materials)

W badaniach zastosowano substancje wzorcowe: o-krezol, m-krezol, 4-chlorofenol, gazy techniczne: wodór – czystość 5,5N z wytwornicy wodoru (Packard, USA), Odczynniki: aceton (czystość do HPLC, POCH, Polska), dichlorometan (POCH, Polska), czterochlorek węgla (Merc, Germany), chloroform (POCH, Polska), 1,1,2,2-tetrachloroetan (POCH, Poland), NaCl (POCH, Polska), kwas solny 35-38% (POCH, Polska), wodorotlenek sodu (POCH, Polska).

2.2. Aparatura (Apparatus)

Chromatograf gazowy HP 5890 II ze spektrometrem mas HP 5972A (Hewlett-Packard, USA), Kolumna kapilarna: Rxi-624Sil MS (60m x 0,25mm x 1,40 μ m) (Restek, USA), Oprogramowanie Chemstation (Agilent, USA) wraz z bibliotekami widm NIST 05 i Wiley 8.0., Wirówka EBA 8S, Hettich (Niemcy), oprogramowanie wspomagające statystyczną kontrolę procesów Minitab®15.

2.3. Metody postępowania (Methods)

2.3.1. Optymalizacja parametrów dyspersyjnej mikroekstrakcji w układzie ciecz-ciecz

W celu doboru optymalnych warunków DLLME, badano wpływ parametrów tj. rodzaj rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, objętość rozpuszczalnika dyspergującego, dodatek soli, czas suszenia soli przed ekstrakcją, pH, a także prędkość i czas wirowania na efektywność ekstrakcji, którą oceniano na podstawie powierzchni pików. Dobór odpowiednich parametrów wyznaczono w oparciu o plan eliminacyjny Plackett'a-Burman'a oraz centralnego planu kompozycyjnego z zastosowaniem programu *Minitab*.

2.3.2. Procedura dyspersyjnej mikroekstrakcji w układzie ciecz-ciecz

Procedura mikroekstrakcji polegała na umieszczeniu 10 mL próbki w fiolce wraz z dodatkiem NaCl. Następnie do roztworu dodawano 0,5 mL rozpuszczalnika ekstrakcyjnego oraz zoptymalizowaną objętość rozpuszczalnika dyspergującego (acetonu). Fiolkę zakręcano szczelnie korkiem, wytrząsano, a następnie odwirowywano. Otrzymaną w ten sposób fazę sedymentacyjną pobierano za pomocą strzykawki mikrolitrowej i dozowano w objętości 2 μ L do chromatografu gazowego.

2.3.3. Warunki analizy chromatograficznej

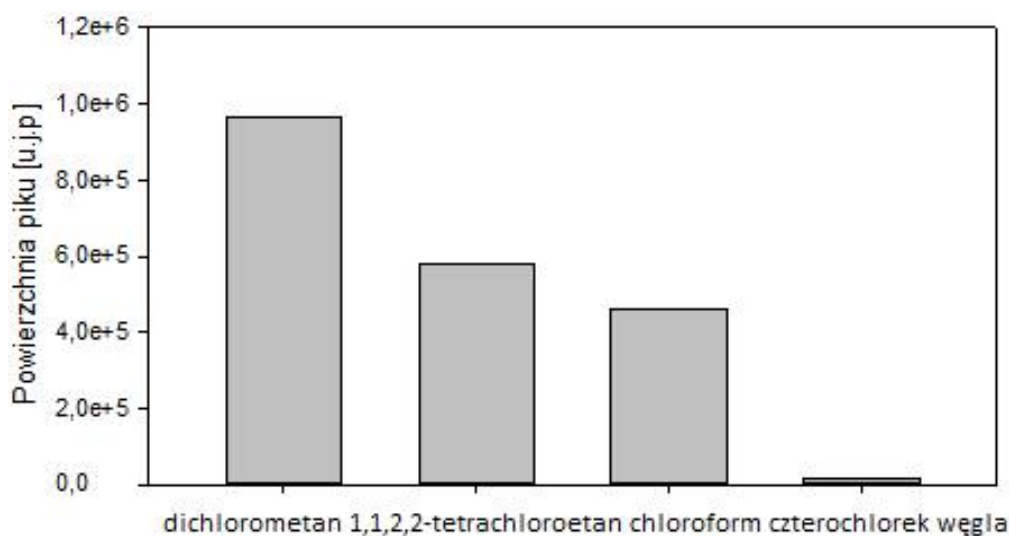
W badaniach stosowano kolumnę kapilarną Rxi-624Sil MS (Restek, USA), gaz nośny: wodór, objętościowe natężenie przepływu 1 mL/min, Temperatura dozownika: 250°C, Temperatura źródła jonów (EI, 70 eV) 200°C, Temperatura linii łączącej chromatograf gazowy z detektorem MS 310°C; Program temperaturowy: 50°C (5 min) – narost 5°C/min -115°C (0 min) – narost 10°C/min - 250°C (5 min), tryb SIM, w którym identyfikowano izomery krezolu na podstawie wartości czasu retencji przy rejestracji sygnału dla wartości m/z równej 107. Sposób optymalizacji warunków rozdzielania opisano we wcześniejszej pracy [13].

3. Wyniki i dyskusja (Results and discussion)

3.1. Dobór rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (Selection of the extraction solvent)

W pierwszym etapie zbadano wpływ rozpuszczalnika ekstrakcyjnego na wzbogacenie analitów, które oceniane było na podstawie porównania pól powierzchni pików pochodzących od izomerów krezolu. W tym celu testowano 4 chlorowane rozpuszczalniki organiczne różniące się gęstością tj. dichlorometan (DCM) (1,33 g/cm³), czterochlorek węgla (1,59 g/cm³), chloroform (1,49 g/cm³) i 1,1,2,2-tetrachloroetan (1,59 g/cm³) w objętości 0,5 mL, przy niezmienionych pozostałych warunkach. Na podstawie uzyskanych wyników, największą wydajność ekstrakcji stwierdzono podczas użycia dichlorometanu, który wykorzystano do dalszych badań.

Na rys. 1 przedstawiono wpływ poszczególnych rozpuszczalników organicznych na wydajność ekstrakcji, dla *m*-krezolu w celu zapewnienia przejrzystości wykresu, gdyż wszystkie badane parametry miały bardzo zbliżony wpływ na obydwie izomery.



Rys. 1. Wpływ typu rozpuszczalnika ekstrakcyjnego na wydajność ekstrakcji techniką DLLME.

Fig. 1. Effect of the type of extraction solvent on efficiency of extraction by DLLME.

3.2. Zastosowanie planu Placketta-Burman'a (Application of Plackett-Burman design)

W celu identyfikacji pozostałych zmiennych, które mają statystycznie istotny wpływ na wydajność ekstrakcji wykorzystano plan eliminacyjny Placketta-Burmana. Czyli plan o rozdzielczości III, w którym oddziaływania dwuczynnikowe są uwikłane z efektami głównymi. Dla każdego z wybranych parametrów określono zakres metody poprzez wyznaczenie najniższych wartości określanych jako poziom dolny (-1), a także najwyższych wartości oznaczanych jako poziom górny (+1). Wszystkie parametry zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Zestawienie niskich i wysokich poziomów zmiennych w macierzy 2^{7-4} planu Placketta-Burmana.
Table 1. A list of low and high levels of factors in 2^{7-4} Plackett–Burman design matrix.

Zmienne (Variables)	Symbol (code)	Poziom (level)	
		Niski (-1) (low)	Wysoki (+1) (high)
pH	A	6	10
Objętość rozpuszczalnika dyspergującego [mL]	B	0,4	1,2
Masa dodatku soli [g NaCl]	C	0	1
Prędkość wirowania [obr/min]	D	3000	5000
Czas wirowania [min]	E	3	7
Czas wytrząsania [min]	F	1	3
Czas suszenia NaCl w 100°C [min]	G	0	30

W badaniach przyjęto macrycę dla 7 zmiennych zgodnie z zasadą tworzenia macierzy według planu dwuczynnikowego Placketta Burmana, w którym wykorzystano możliwie najmniejszą liczbę układów, równą 8. Zastosowaną macierz przedstawiono w tabeli 2.

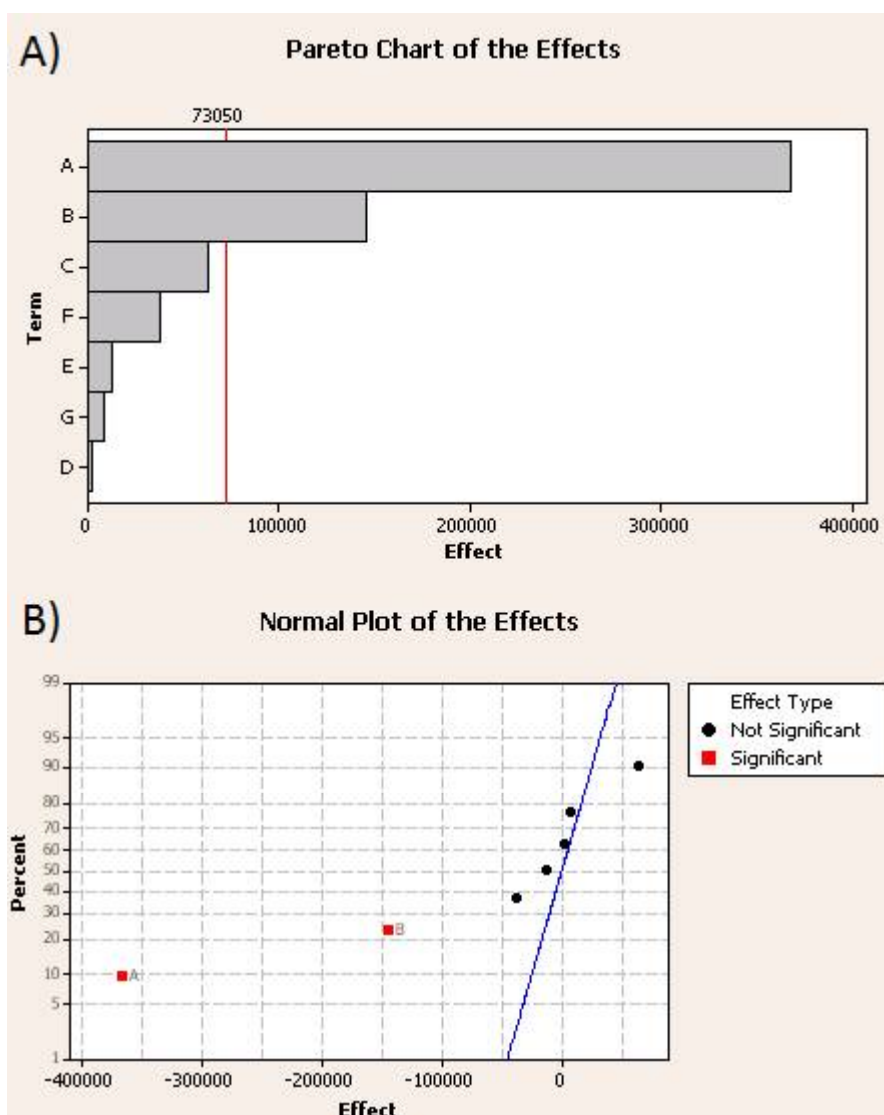
Tabela 2. Macryca planu czynnikowego Placketta-Burmana dla zbadania siedmiu zmiennych ($k = 7$), którym przypisano dwa poziomy wartości w ramach ośmiu doświadczeń ($N = 8$).

Table 2. The matrix of Plackett-Burman design for investigation of seven variables ($k = 7$) which are assigned to two levels for the eight experiments ($N = 8$).

Lp.	A	B	C	D	E	F	G
1.	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
2.	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
3.	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1
4.	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1
5.	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1
6.	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1
7.	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
8.	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1

Główny wpływ poszczególnych czynników określano na podstawie całkowitych pól powierzchni pików. Wykres Pareto, przedstawiony na rys. 2 A) prezentuje w sposób wizualny czynniki mające wpływ na efektywność ekstrakcji. Przy czym pozioma kreska określa 95% poziom ufności. Uzyskane wyniki wskazują, że parametrami mającymi statystycznie istotny wpływ na odzyski analitów są przede wszystkim pH, a także objętość rozpuszczalnika dyspergującego. W mniejszym stopniu wpływ może mieć również efekt wysalania, czyli dodatek NaCl. Czynniki tj. pH oraz rozpuszczalnik dyspergujący wykazują ujemny efekt, co zostało przedstawione na rys. 2 B), gdzie zaznaczone są wyłącznie punkty A i B, gdyż jedynie one mają wyraźny wpływ na efekt końcowy procesu. Pozostałe parametry zgodnie z zastosowanym planem jedynie w niewielkim stopniu mogą wpływać na zmiany pól powierzchni pików, dlatego na rys. 2 B) nie zostały oznaczone.

Na wykresach przedstawiono wpływ poszczególnych parametrów dla m-krezolu, ponieważ wartości uzyskane dla o-krezolu są niemal identyczne.



Rys. 2. A). Wykres Pareto przedstawiający wpływ głównych parametrów i B). Wykres przedstawiający dodatni lub ujemny wpływ poszczególnych czynników. Pionowa linia na wykresie określa poziom ufności 95%.

Fig. 2. A). Pareto chart of standardized main effect, B). Normal plot showing positive or negative impact of factors. Vertical line in the chart defines 95% confidence level.

3.3. Zastosowanie centralnego planu kompozycyjnego (Application of central composite design)

Na podstawie uzyskanych wartości z planu Placketta-Burman'a, czynniki, które uznane zostały za mające statystycznie istotny wpływ na efektywność ekstrakcji, w dalszym etapie poddano optymalizacji z zastosowaniem centralnego planu kompozycyjnego. W tym celu wyznaczono dla dwóch parametrów zarówno poziom niski (-1), wysoki (+1), a także centralny (0) oraz tzw. punkty gwiazdne wynoszące odpowiednio $\alpha = -1,4$ i $\alpha = 1,4$. Są to punkty leżące na osiach trójwymiarowej powierzchni odpowiedzi. Wartości wyznaczonych punktów zawarto w tabeli 3.

Tabela 3. Zestawienie niskich, wysokich i centralnych poziomów zmiennych w macierzy 2^3 planu centralnych kompozycji.

Table 3. A list of low, high and central levels of factors in the 2^3 central composite design.

Zmienna (Variables)	Symbol	Poziom (Level)			Gwiazdne punkty (Star points) ($\alpha=1,4$)	
		Niski (-1)	Centralny (0)	Wysoki (+1)	$-\alpha$	$+\alpha$
pH	A	6	8	10	4	14
Objętość rozpuszczalnika dyspergującego [mL]	B	0,4	0,8	1,2	0	1,68

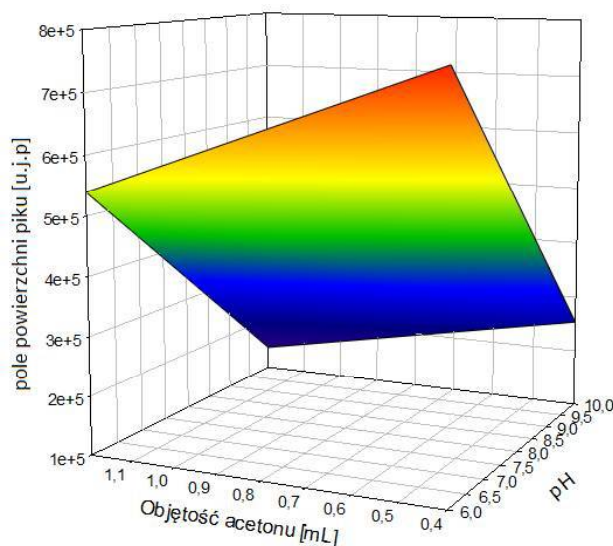
Tabela 4. Warunki eksperymentalne wykorzystywane w celu przeprowadzenia optymalizacji z zastosowaniem centralnego planu 2^3 kompozycyjnego.

Table 4. Experimental conditions used to perform the optimization using the 2^3 central composite design.

A	B
-1	-1
-1	1
1	-1
1	1
-1,4	0
+1,4	0
0	-1,4
0	+1,4
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0

Zgodnie z zasadami tworzenia centralnego planu kompozycyjnego w celu optymalizacji dwóch parametrów należało przygotować 13 nowych próbek, jednak z uwagi na założony brak istotności pozostałych parametrów, możliwe było wykorzystanie czterech wyników z planu Placketta-Burmana.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że zastosowanie pH 6, a także najniższej z założonych objętości rozpuszczalnika dyspergującego, pozwala na najefektywniejsze przeprowadzenie dyspersyjnej mikroekstrakcji w układzie ciecz-ciecz. Uzyskane wartości są zbieżne z wykresem współzależności parametrów wyznaczonym na podstawie wartości z planu Placketta-Burmana, który przedstawiono na rys. 3.



Rys. 3. Powierzchnie współzależności dwóch parametrów w planie Placketta-Burman'a.
Fig. 3. The surfaces of correlation two parameters in the Plackett-Burman design.

4. Wnioski (Conclusions)

W pracy przedstawiono możliwość zastosowania frakcyjnych planów czynnikowych w celu wykonania optymalizacji dyspersyjnej mikroekstrakcji w układzie ciecz-ciecz. Zastosowane plany czynnikowe w dużej mierze przyczyniły się do skrócenia czasu wykonania optymalizacji, zmniejszenia ilości odczynników, przy jednoczesnym zwiększeniu ilości uzyskanych informacji. Umożliwiły wyznaczenie parametrów mających rzeczywisty wpływ na efektywność ekstrakcji, a także określenie ich współzależności, przy niewielkich ilościach wykonanych analiz. Zastosowanie zoptymalizowanej metody do badania próbek ścieków rafineryjnych pod kątem jej przydatności do badania zawartości izomerów krezoli będzie przedmiotem kolejnej pracy.

5. Literatura (References)

1. A. Starek, *Krezol – mieszanina izomerów*, PiMOŚP, 1 (2007) 95.
2. G. Boczkaj, A. Przyjazny, M. Kamiński, *Characteristics of volatile organic compounds emission profiles from hot road bitumens*, Chemosphere **107** (2014), 23–30
3. Lanouette, K.H., *Treatment of phenolic wastes.*, Chem. Eng. **84** (1977) 99.
4. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 24 lipca 2006 r. w sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu ścieków do wód lub do ziemi, oraz w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego. Dz.U.06.137.984
5. G. Boczkaj, P. Makoś, *Zastosowanie technik rozdzielania do identyfikacji i oznaczania lotnych związków tlenoorganicznych stosowanych w analizie procesowej wody i ścieków*, Cam. Sep. **6** (2014) 23.
6. G. Boczkaj, M. Kamiński, A. Przyjazny, *Process control and investigation of oxidation kinetics of postoxidative effluents using gas chromatography with pulsed flame photometric detector (GC-PFPD)*, Ind. Eng. Chem. Res. **49** (2010) 12654.
7. G. Boczkaj, A. Przyjazny, M. Kamiński, *New Procedures for Control of Industrial Effluents Treatment Processes*, Ind. Eng. Chem. Res. **53** (4) (2014), 1503.
8. A. Kovács, M. Mörtl, A. Kende, *Development and optimization of a method for the analysis of phenols and chlorophenols from aqueous samples by gas chromatography–mass spectrometry, after solid phase extraction and trimethylsilylation.*, Microchem. J. **99** (2011) 125.
9. M. Saraji, M. Bakhshi, *Determination of phenols in water samples by single-drop micro-extraction followed by in-syringe derivatization and gas chromatography–mass spectrometric detection*, J. Chromatogr. A **1098** (2005) 30.
10. M. Rezaee, Y. Assadi, M-R. M. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid micro-extraction*, J. Chromatogr. A **1116** (2006) 1.
11. FDA, *Guidance for Industry PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance*, 2004.
12. L. B. Abdur'uf, G. H. Tan, *Chemometric approach to the optimization of HS-SPME/GC–MS for the determination of multiclass pesticide residues in fruits and vegetables*, Food Chem. **177** (2015) 267.
13. A.N. Panagiotou, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, *Application of chemometric assisted dispersive liquid–liquid microextraction to the determination of personal care products in natural waters*, Anal. Chim. Acta **649** (2009) 135.
14. Montgomery D.C., *Design and Analysis of Experiments*, 6th Ed., Wiley, 2005.
15. <https://onlinecourses.science.psu.edu/stat503/node/59> (data dostępu: 27.06.2015).
16. G. Boczkaj, P. Makoś, *Separation of Volatile Oxygen-containing Organic Compounds by Gas Chromatography – selectivity comparison of different polarity stationary phases*, Cam. Sep. **5** (2) (2013) 143-151