

POLITECHNIKA ŚLĄSKA
WYDZIAŁ INŻYNIERII ŚRODOWISKA I ENERGETYKI
KATEDRA BIOTECHNOLOGII ŚRODOWISKOWEJ



**Politechnika
Śląska**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Aktywność biobójcza ditlenku chloru w wieloskładnikowych preparatach dezynfekcyjnych

Biocidal activity of chlorine dioxide in multi-component disinfectants

Dyscyplina: inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka

mgr inż. Weronika AUGUSTYN

Promotorzy pracy:
dr hab. inż. Joanna Kalka, prof. PŚ
dr hab. inż. Wiesław Hreczuch, MEXEO

Opiekun pomocniczy:
dr inż. Arkadiusz Chruściel, MEXEO

Praca badawcza finansowana w ramach:
Programu Doktorat Wdrożeniowy – II edycja na Wydziale Inżynierii Środowiska i Energetyki
Politechniki Śląskiej

Gliwice, 2023

Załącznik 1.

Oznaczanie spektrofotometryczne ClO₂ w roztworach wodnych – barwniki spektrofotometryczne

1. Metodyka

1.1. Procedura

Roztwory ClO₂ wykorzystywane do badań spektrofotometrycznych sporządzono poprzez odpowiednie rozcieńczenie podstawowego roztworu wzorcowego (sporządzonego wg pkt 5.1.1. rozprawy doktorskiej) i oznaczonego metodą miareczkowania woltamperometrycznego wg pkt.5.1.2. rozprawy. Metoda woltamperometryczna traktowana była jako bezwzględna metoda odniesienia.

1.1.1. Oznaczanie zawartości ClO₂ metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem amarantu (AM):

Roztwór amarantu przygotowano poprzez rozpuszczenie 150 mg amarantu, 25 mg heksametafosforanu sodu, 121,2 mg chlorku amonu oraz 30 mL 25% roztworu amoniaku w wodzie destylowanej w kolbie miarowej o poj. 500 mL.

Próbki do pomiaru przygotowywano w kolbkach miarowych o poj. 25 mL. Pobierano 2,5 mL roztworu barwnika i dopełniano roztworem ClO₂ do kreski. Zawartość ClO₂ jest proporcjonalna do różnicy pomiędzy absorbancjami próbki ślepej, zawierającej wodę zamiast roztworu ClO₂, i mierzonej z badanym roztworem ClO₂ przy

$\lambda_{max} = 520 \text{ nm}$.

1.1.2. Oznaczanie zawartości ClO₂ metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem zieleni lizaminowej typu B (LGB):

Roztwór LGB przygotowano poprzez rozpuszczenie w 250 mL wody destylowanej 240,2 mg zieleni lizaminowej. W celu sporządzenia buforu amonowego rozpuszczono 24,2 mg chlorku amonu oraz 6 mL roztworu amoniaku o stężeniu 25% w wodzie destylowanej w kolbie miarowej o pojemności 500 mL.

Próbki do pomiaru przygotowano w kolbkach miarowych o poj. 25 mL. Pobierano 0,25 mL r ru barwnika oraz 2,5 mL buforu amonowego i dopełniono roztworem ClO₂ do kreski. Zawartość ClO₂ jest proporcjonalna do różnicy pomiędzy absorbancjami próbki ślepej, zawierającej wodę zamiast roztworu ClO₂, i mierzonej z badanym roztworem ClO₂ przy $\lambda_{max} = 615 \text{ nm}$.

1.1.3. Oznaczanie zawartości ClO₂ metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem czerwieni chlorofenolowej (CPR)

Roztwór CPR przygotowano poprzez rozpuszczenie 0,2 g barwnika w 500 mL wody. Za pomocą mianowanego 1M roztworu NaOH doprowadzono roztworu pH do wartości 6,5. Bufor cytrynianowy przygotowano poprzez rozpuszczenie 19,4 g dwuwodnego cytrynianu trisodu oraz 6,9 g kwasu cytrynowego jednowodnego w wodzie destylowanej w kolbie miarowej o poj. 100 mL.

Przygotowano również roztwór 2-amino-2-metylo-1-propanolu poprzez rozpuszczenie w 100 mL wody destylowanej 17,8 g związku.

Próbki do pomiaru przygotowano w kolbach miarowych o poj. 25 mL. Pobierano 0,25 mL buforu cytrynianowego i 0,5 mL czerwieni chlorofenolowej i dopełniono próbką do kreski. Po wymieszaniu do każdej kolbki dodano 0,25 mL roztworu 2-amino-2-metylo-1-propanolu. Stężenie ClO₂ jest proporcjonalne do różnicy pomiędzy absorbancjami próbki ślepej, zawierającej wodę zamiast roztworu ClO₂, i mierzonej z badanym roztworem ClO₂ przy $\lambda_{max} = 574 \text{ nm}$.

1.2. Walidacja metod spektrofotometrycznych

1.2.1. Badania stabilności próbek w czasie

Badania stabilności próbek w czasie dokonano na podstawie analizy zmian absorbancji w czasie dla roztworów o stężeniu 0,0; 0,5; 2,5 oraz 5,0 ppm wag. ClO₂. Pomiarów dokonywano przez 2 h z częstotliwością co 10 min w pierwszej godzinie i co 30 min w drugiej godzinie.

1.2.2. Sporządzanie krzywych kalibracyjnych

Sporządzono krzywe kalibracyjne w zakresach:

- 0,0-0,5 ppm wag.,
- 0,0-1,0 ppm wag.,
- 0,0-2,5 ppm wag.,

Krzywą kalibracyjną, a więc zależność stężenia ClO₂ w roztworach wodnych od absorbancji wyznaczono metodą regresji liniowej. Granice przedziału ufności omawianej krzywej skonstruowano wg Równania 1:

$$w(A_i) = \hat{w}(A_i) \pm t_{\alpha, N-2} * \sqrt{s_{\hat{w}}^2 * \left[\frac{1}{N} + \frac{(A_i - \bar{A})^2}{\sum_{k=1}^N (A_k - \bar{A})^2} \right]} \quad (1)$$

- gdzie:
- $w(A_i)$ – wartość oczekiwana stężenia ClO₂ dla absorbancji A_i , ppm
- $\hat{w}(A_i)$ – wartość stężenia ClO₂ obliczona na podstawie krzywej kalibracyjnej, ppm
- $t_{\alpha, N-2}$ – statystyka o rozkładzie *t*-Studenta o $N-2$ stopniach swobody i poziomie ufności, $\alpha = 0,025$
- A_i – wartość absorbancji z szeregu przedziału ufności, AU
- \bar{A} – średnia arytmetyczna zmierzonych wartości absorbancji, AU
- A_k – wartość absorbancji z szeregu kalibracyjnego, AU
- N – liczba par zmierzonych wartości absorbancji i stężenia
- $s_{\hat{w}}^2$ – wariancja reszt dana Równaniem 2:

$$s_{\hat{w}}^2 = \frac{1}{N-2} * \sum_{k=1}^N [(w(A_i) - \hat{w}(A_i))]^2 \quad (2)$$

- Błąd względny w przedmiotowym zakresie pomiarowym wyznaczono wg Równania 3:

$$\delta = \frac{|w(A_i) - \hat{w}(A_i)|}{\hat{w}(A_i)} = \frac{t_{\alpha, N-2} * \sqrt{S_{\hat{w}}^2 * \left[\frac{1}{N} + \frac{(A_i - \bar{A})^2}{\sum_{k=1}^N (A_k - \bar{A})^2} \right]}}{\hat{w}(A_i)} * 100\% \quad (3)$$

Na podstawie sporządzonych krzywych, wyznaczono współczynnik korelacji R. Wartości LOD i LOQ wyznaczone zostały na podstawie krzywej, w której uzyskano najwyższe wartości współczynnika korelacji R oraz najniższe wartości minimalnych błędów względnych. Wartości LOD (*Limit of detection*) oraz LOQ (*Limit of quantification*) wyznaczono zgodnie z Równaniami 4 i 5:

$$LOD = \frac{3,3 * S}{a}, \quad (1)$$

$$LOQ = \frac{10 * S}{a}, \quad (2)$$

gdzie:

S – odchylenie standardowe absorbancji z 3 pomiarów próbki ślepej,

a – współczynnik nachylenia krzywej kalibracyjnej.

1.2.3. Powtarzalność wyników

Wykonano 3 niezależne oznaczenia ClO₂ w próbkach o stężeniu: 0,00; 0,25, 0,50; 0,75 i 1,00 ppm *wag.* Wyznaczono średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe (S), względne odchylenie standardowe (RSD) oraz współczynnik zmienności (CV) zgodnie z Równaniami 3 i 4:

$$RSD = \frac{S}{A_{\text{sr}}}, \quad (3)$$

gdzie:

S – odchylenie standardowe absorbancji z 3 powtórzeń dla danego stężenia,

A_{sr} – średnia wartość absorbancji, z 3 powtórzeń dla danego stężenia

$$CV = RSD * 100\%, \quad (4)$$

gdzie:

RSD – względne odchylenie standardowe.

1.2.4. Interferencje

Przygotowano roztwory wyjściowe zawierające 25, 50 i 75 ppm *wag.* ClO₂. Roztwory zawierały tylko ClO₂ jak również ClO₂ wraz z interferentami, tj. 0,5% przyspieszacza aktywacji 1 lub przyspieszacza aktywacji 2, 0,56% chlorynu sodu (NaClO₂) lub 2% surfaktantu.

Każdy z przygotowanych roztworów wyjściowych rozcieńczono do 1 ppm *wag.* ClO₂ i wykonywano analizę spektrofotometryczną, zgodnie z procedurą oznaczania dla poszczególnych barwników spektrofotometrycznych. Zbadano również próbki ślepe – pozbawione ClO₂. Każdą z analiz wykonywano w 3 powtórzeniach. Na podstawie średniej absorbancji obliczono wartość ΔA jako różnicę próbki ślepej (wody) i próbki mierzonej (ClO₂ lub ClO₂ + interferent).

Wpływ interferentów określono na podstawie % odzysku (*Recovery*). Jest to stosunek ΔA próbki z ClO_2 i interferentem do wartości ΔA dla próbki zawierającej jedynie ClO_2 .

$$\text{Rec} = \frac{\Delta A_{\text{ClO}_2}^i}{\Delta A_{\text{ClO}_2}} * 100\% \quad (23)$$

gdzie:

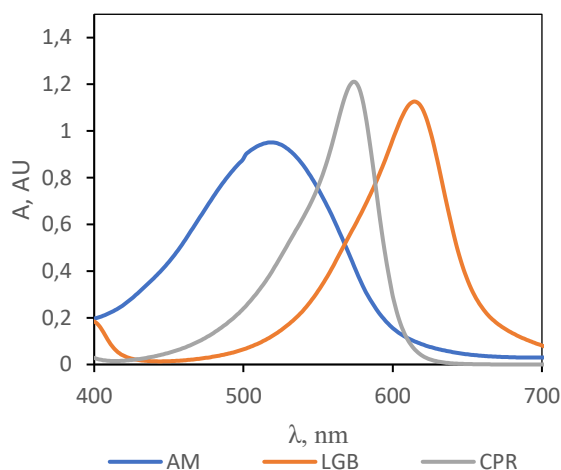
Rec – procent odzysku, %

$\Delta A_{\text{ClO}_2}^i$ – różnica absorbancji ($\Delta A = \text{ślepa} - \text{mierzona}$) w próbkach zawierających ClO_2 + interferent

ΔA_{ClO_2} – różnica absorbancji ($\Delta A = \text{ślepa} - \text{mierzona}$) w próbkach zawierających ClO_2

2. Wyniki

Rysunek 1 przedstawia widma barwników spektrofotometrycznych wykorzystywanych do oznaczania zawartości ClO_2 w roztworach wodnych. Maksimum absorpcji dla AM wyznaczono przy długości fali $\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$; LGB przy długości fali $\lambda_{\text{max}} = 615 \text{ nm}$ oraz CPR przy długości fali $\lambda_{\text{max}} = 574 \text{ nm}$.



Rysunek 1. Widma ukazujące maksima absorpcji dla poszczególnych barwników spektrofotometrycznych.

Badanie stabilności w czasie wg metody z wykorzystaniem AM dla roztworów o stężeniach 0,0; 0,5; 2,5 ppm *wag.* ClO_2 nie wykazuje istotnych różnic w pomiarach absorbancji. Dla roztworu o stężeniu 5,0 ppm *wag* różnica wynosi 0,018 jednostek. Dla metod z wykorzystaniem LGB oraz CPR dla roztworów o stężeniach 0,0 oraz 0,5 ppm *wag* ClO_2 również nie zaobserwowano znaczących różnic w pomiarach absorbancji. W przypadku LGB dla roztworu o stężeniu 2,5 ppm *wag* różnica absorbancji w czasie wynosi 0,18 jednostek, a dla roztworu o stężeniu 5,0 ppm *wag* – 0,032 jednostek. Dla CPR z kolei wartości dla roztworów o stężeniach 2,5 oraz 5 ppm *wag* wynoszą odpowiednio 0,024 i 0,018 jednostek absorbancji. W przypadku metody z wykorzystaniem CPR obserwuje się wzrost wartości absorbancji w czasie (Tabela 1).

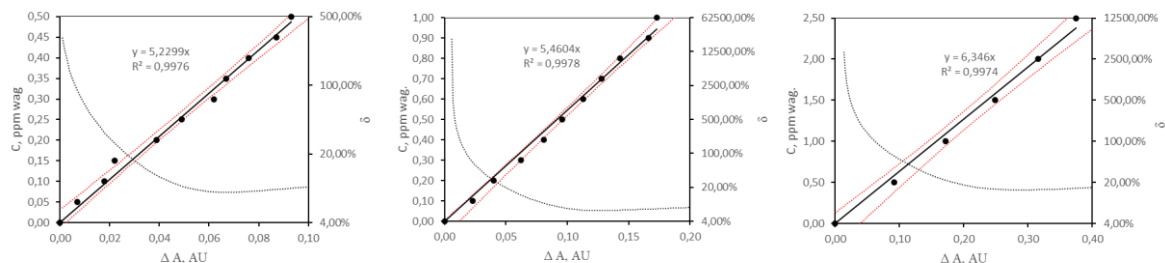
Tabela 1. Wyniki absorpcji roztworów o zawartości 0,0; 0,5; 2,5; 5,0 mg/L ClO₂ w czasie dla poszczególnych metod spektrofotometrycznych.

t, min	C, ppm wag			
	0,0	0,5	2,5	5,0
Amarant				
10	0,930	0,825	0,520	0,239
20	0,931	0,824	0,510	0,238
30	0,932	0,826	0,519	0,238
40	0,932	0,828	0,526	0,239
50	0,933	0,825	0,517	0,239
60	0,935	0,827	0,518	0,234
90	0,936	0,827	0,513	0,230
120	0,934	0,825	0,514	0,221
LGB				
10	1,148	1,036	0,536	0,207
20	1,148	1,032	0,533	0,202
30	1,146	1,032	0,530	0,198
40	1,144	1,031	0,528	0,195
50	1,147	1,029	0,526	0,193
60	1,145	1,030	0,524	0,187
90	1,147	1,030	0,521	0,180
120	1,145	1,030	0,518	0,175
CPR				
10	0,982	0,769	0,185	0,084
20	0,979	0,770	0,189	0,090
30	0,981	0,769	0,195	0,092
40	0,977	0,770	0,201	0,094
50	0,981	0,770	0,208	0,095
60	0,98	0,771	0,205	0,097
90	0,984	0,771	0,208	0,101
120	0,987	0,772	0,209	0,102

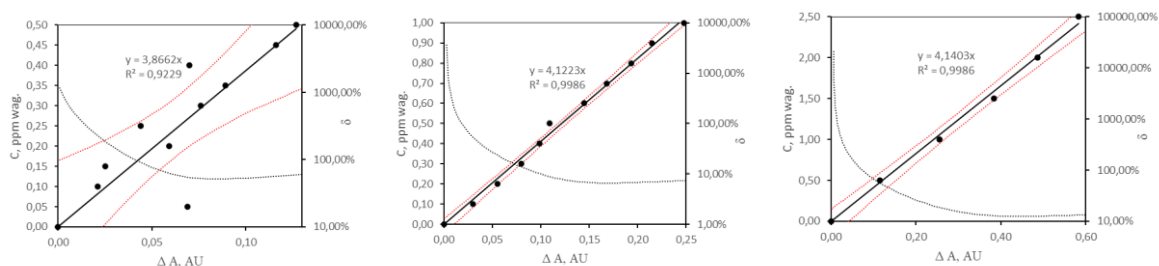
Podobnie jak w przypadku metody bezpośredniego pomiaru widma UV-VIS, dla metod wykorzystujących barwniki spektrofotometryczne wyznaczono graficzny obraz stężenia ClO₂ od absorpcji wraz z granicami przedziału ufności i wartościami błędów względnymi (Rysunek 2). Dla metody z wykorzystaniem AM minimalny przedział błędów względnymi występuje w przedziale absorpcji 0,11-0,15, co odpowiada stężeniom 0,6-0,9 ppm wag. ClO₂ (krzywa w zakresie 0,0-1,0 ppm wag. ClO₂). W przypadku metody z wykorzystaniem LGB, podobnie jak w przypadku AM, minimalny przedział błędów względnymi uzyskano w zakresie krzywej 0,0-1,0 ppm wag. ClO₂. Wynosi 6,6-6,9% w przedziale absorpcji 0,14-0,21 i odpowiada stężeniom 0,5-0,9 ppm wag. ClO₂. Dla metody z wykorzystaniem CPR minimalny przedział błędów względnymi wynosi 4,7-4,9% i występuje

w przedziale absorbancji 0,12-0,18, co odpowiada stężeniom 0,2-0,3 mg/L (krzywa w zakresie 0,0-0,5 mg/L ClO₂).

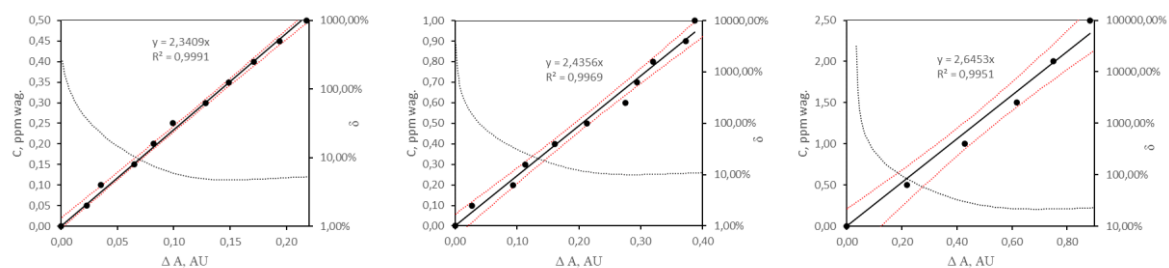
AM:



LGB:



CPR:



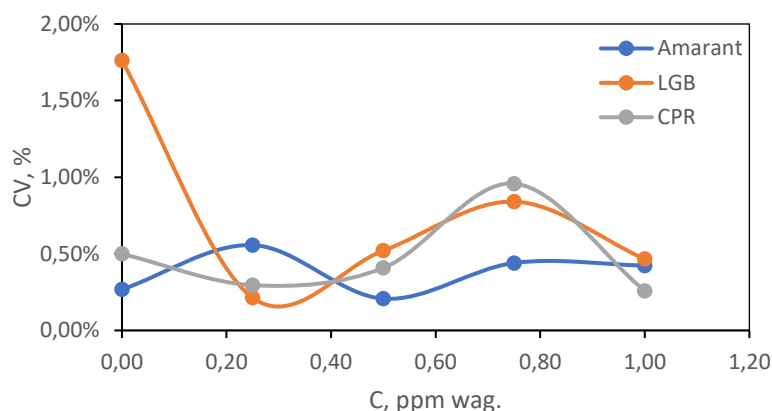
Rysunek 2. Krzywe kalibracyjne spektrofotometrycznych metod oznaczania ClO₂ w roztworach wodnych z wykorzystaniem barwników spektrofotometrycznych: AM przy λ=520 nm; LGB przy λ=615 nm; CPR przy λ=574 nm.

Tabela 2 przedstawia wartości LOD i LOQ dla zakresów krzywych, dla których uzyskano najwyższe współczynniki korelacji R i jednocześnie najmniejsze wartości przedziałów błędów względnych. Wartości LOD LOA nie przekraczają 0,2 ppm wag. ClO₂.

Tabela 2.. Wyznaczenie parametrów LOD i LOQ dla poszczególnych metod spektrofotometrycznych

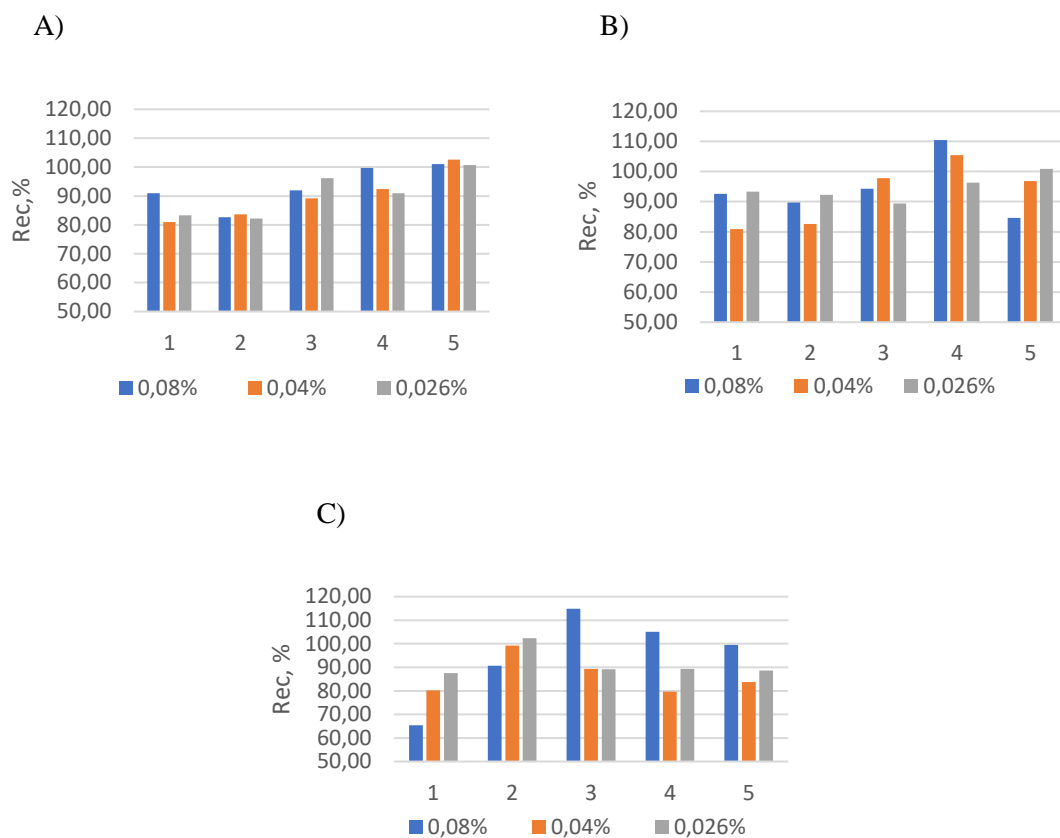
Zakres krzywej $C=a*\Delta A$	a	R	LOD, ppm wag.	LOQ, ppm wag.
AM				
0,0-1,0	5,4604	0,998	0,050	0,152
LGB				
0,0-1,0	4,1223	0,999	0,032	0,098
CPR				
0,0-0,5	2,4356	0,997	0,034	0,104

Miarą precyzji, a co za tym idzie miarą zróżnicowania rozkładu cechy jest współczynnik zmienności (CV). Na Rysunku 3 przedstawiono wykres zależności współczynnika zmienności CV od stężenia ClO₂ w roztworach. Dla metody z wykorzystaniem amarantu i CPR współczynnik zmienności nie przekracza 1%. W przypadku metody z wykorzystaniem LGB współczynnik CV nie przekracza 2%.



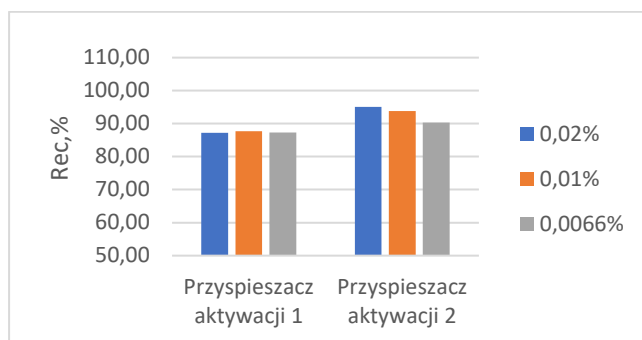
Rysunek 3. Współczynnik zmienności dla różnych stężeń roztworów ClO₂.

Na Rysunkach 4-6 przedstawiono procent odzysku ClO₂ w obecności interferentów, tj. surfaktantów, przyspieszaczy aktywacji oraz NaClO₂ w próbce. Stężenie ClO₂ w mierzonych próbkach wynosiło 1 ppm wag. zaś interferentów, wg danych na poszczególnych wykresach. Otrzymane wartości stopnia odzysku w obecności matrycy organicznej w znaczący sposób zaburzają oznaczalność zawartości ClO₂ w roztworze. Wyniki są niemiernodajne.

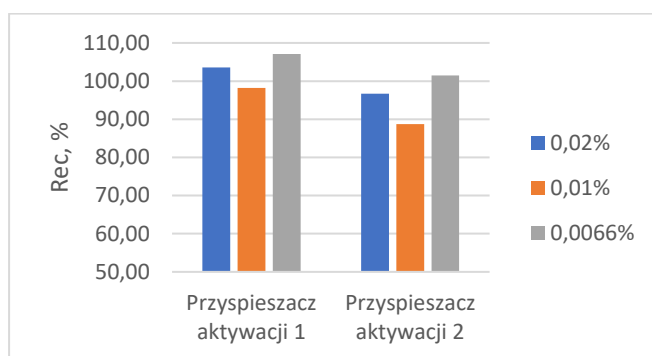


Rysunek 4. Procent odzysku ClO_2 dla poszczególnych metod spektrofotometrycznych A – AM; B – LGB; C – CPR. Roztwory zawierające 1 ppm wag. ClO_2 oraz surfaktanty we wskazanych stężeniach: 1- N-tlenek C12-14 alkilodimetyloamina; 2- Kokamidopropylobetaina; 3- Alkohol C9-11 etoksyłowany; 4- Drugorzędowa sól sodowa alkanosulfonianu C14-17; 5- Sól sodowa kwasu alkilobenzenosulfonowego C10-13.

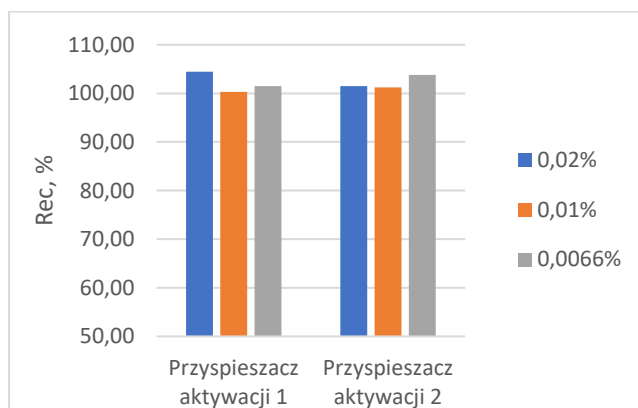
A)



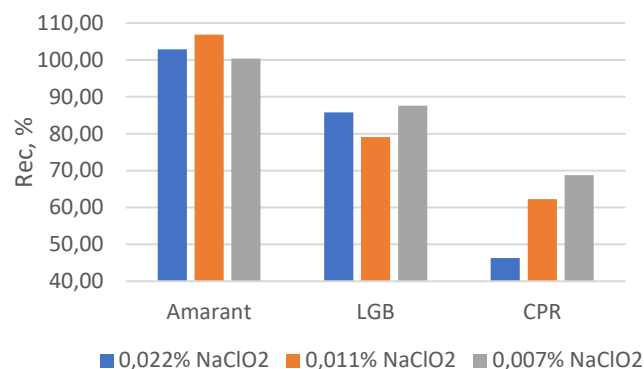
B)



C)



Rysunek 5. Procent odzysku ClO_2 dla poszczególnych metod spektrofotometrycznych A – AM; B – LGB; C – CPR. Roztwory zawierające 1 mg/L ClO_2 oraz przyspieszacze aktywacji we wskazanych stężeniach.



Rysunek 6. Procent odzysku ClO₂ dla roztworów zawierających 1 mg/L ClO₂ oraz NaClO₂ we wskazanych stężeniach w roztworze.

3. Wnioski

Metody spektrofotometryczne oznaczania zawartości ClO₂ w roztworach wodnych z wykorzystaniem barwników nie mogą być zastosowane do oznaczania ClO₂ w układach zawierających matrycę organiczną. Dodatkowe układy redoks zachodzące pomiędzy interferentami, a barwnikami spektrofotometrycznymi oraz pomiędzy interferentami a ClO₂ w znaczący sposób zaburzają oznaczalność ClO₂.