

IZOLACJA I OZNACZANIE LOTNYCH ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH W FAZIE GAZOWEJ METODĄ SPME/GC-MS

Wprowadzenie

Celem niniejszego ćwiczenia jest zapoznanie się z techniką mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME) z fazy nadpowierzchniowej oraz zbadanie wpływu wybranych czynników na wydajność wydzielania substancji lotnych (BTEX – benzen, toluen, etylobenzen, ksyleny) z wody techniką SPME.

Metody wydzielania substancji lotnych z próbek wodnych dzielimy na:

- **statyczne** (polegające na analizie warstwy nadpowierzchniowej – ustala się stan równowagi między fazą nadpowierzchniową i wodną w określonych warunkach),
- **dynamiczne** (wykorzystuje się przepływ gazu do całkowitego wyczerpania zawartości substancji oznaczanej w fazie ciekłej, a nie do stanu równowagi),
- **SPME** (mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej).

Technika mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (**SPME** – *Solid Phase Microextraction*) opracowana została przez Pawliszyna i jego współpracowników w 1987 roku, natomiast sprzęt do SPME został wprowadzony na rynek przez firmę Supelco w 1992 roku. Urządzenie do SPME jest rodzajem zmodyfikowanej mikrostrzykawki. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej może być zastosowana zarówno do próbek ciekłych, jak i gazowych. W obu przypadkach zachodzi podział analitów między matrycę próbki a fazę stacjonarną.

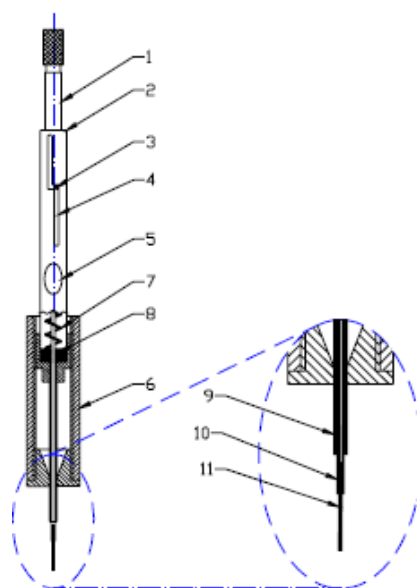
Głównym elementem urządzenia do SPME jest włókno z naniesioną na nie fazą stacjonarną. Fazę stacjonarną o grubości od 7 μm do 100 μm stanowią najczęściej:

- ciekłe polimery, np. polidimetylosiloksan (PDMS) lub inne, stosowane w kolumnach kapilarnych,
- polimery stałe, np. poliakrylan (PA),
- kopolimery, np. styrenu z diwinylobenzenem (DVB), (w postaci mikrogranulek umieszczone w fazie stacjonarnej).

Proces wydzielania analitów metodą mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej składa się z dwóch zasadniczych etapów:

- izolacji i wzbogacenia z próbki wodnej lub fazy gazowej do fazy stacjonarnej naniesionej na włókno,
- uwolnieniu analitów poprzez desorpcję bezpośrednio do analizatora, którym najczęściej jest chromatograf gazowy (GC).

Urządzenie do SPME przedstawiono schematycznie na rys. 1. Głównym elementem przyrządu do SPME jest włókno kwarcowe pokryte fazą stacjonarną na długości 10 mm, a w przypadku włókien typu StableFlex na długości 20 mm. Włókno kwarcowe jest osadzone w rurce ze stali nierdzewnej. Rurka ta umieszczona jest w specjalnym uchwycie, który przypomina strzykawkę. Naciśnięcie tłoka powoduje wysunięcie włókna z igły. W obudowie uchwytu znajduje się wycięcie pozwalające na zablokowanie tłoka w pozycji wysuniętej. Po odblokowaniu tłoka powraca do położenie wyjściowego, dzięki czemu włókno chowa się ponownie w igłę. W zależności od rodzaju włókna końcówka mocująca rurkę stalową ma różny kolor, który można łatwo sprawdzić przez otwór znajdujący się w obudowie przyrządu.

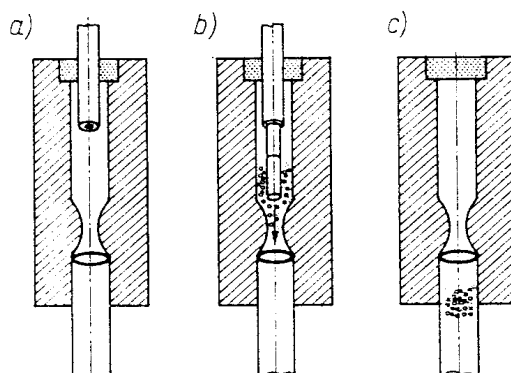


Rys. 1. Schemat urządzenia do mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (1 - tłok, 2 - obudowa, 3 - śruba prowadząca, 4 - wycięcie w obudowie, 6 - prowadnica igły, ogranicznik głębokości, 7 - sprężyna, 8 - uszczelka, 9 - igła, 10 - rurka stalowa, 11 - włókno kwarcowe pokryte fazą stacjonarną)

W celu wykonania analizy za pomocą SPME igłą, w której schowane jest włókno, przebija się membranę zamykającą pojemnik z próbką. Następnie, przez naciśnięcie tłoka, włókno wysuwa się z igły i następnie jego kontakt z próbką ciekłą lub fazą gazową znajdującą się nad próbką. Organiczne anality sorbują się w fazie stacjonarnej znajdującej się na włóknie kwarcowym. Po określonym czasie, zależnym od rodzaju analitów, włókno ponownie chowa się w igłę i cały przyrząd przenoszony jest do chromatografu gazowego. Jeśli wymagane jest przeniesienie „strzykawkę” do innego laboratorium, to otwór w igle należy zamknąć (np. za pomocą fragmentu membrany chromatograficznej).

Następnym etapem analizy jest termodesorpcja analitów z włókna. Odbywa się ona w następujący sposób: igła przyrządu wprowadzana jest przez membranę chromatograficzną

do gorącego dozownika, następnie włókno jest z niej wysuwane i poddawane działaniu wysokiej temperatury. Powoduje to uwolnienie analitów zatrzymanych na fazie stacjonarnej i przeniesienie ich za pomocą gazu nośnego na kolumnę chromatograficzną, gdzie następuje ich rozdzielenie, a następnie oznaczenie ilościowe w detektorze. Na rys. 2 przedstawiono etapy desorpcji analitów w dozowniku chromatograficznym. Czas termodesorpcji uzależniony jest od rodzaju analitów, a temperatura termodesorpcji zależy od rodzaju pokrycia włókna. Po zakończeniu termodesorpcji i po schowaniu włókna do igły urządzenie zostaje wyciągnięte z dozownika i ponownie wykorzystane w procesie ekstrakcji.



Rys. 2. Etapy desorpcji analitów z włókna SPME w dozowniku chromatograficznym: a) przebicie igłą membrany dozownika, b) desorpcja termiczna analitów, c) ogniskowanie analitów na włocie do kolumny chromatograficznej

Ekstrakcję analitów metodą SPME można prowadzić na dwa sposoby:

1. DI (Direct Immersion) - SPME - umieszczenie włókna bezpośrednio z próbce gazowej lub względnie czystej próbce ciekłej. Takiego toku postępowania nie można stosować w odniesieniu do próbek stałych lub silnie zanieczyszczonych próbek ciekłych.
2. HS (Headspace) - SPME - umieszczenie włókna w fazie nadpowierzchniowej. Lotne związki zazwyczaj z łatwością przechodzą do fazy nadpowierzchniowej, chyba że są silnie związane z matrycą, jak np. niektóre próbki stałe. Związki o mniejszej lotności również przechodzą do fazy nadpowierzchniowej, ale proces ten może być długotrwały, co powoduje wydłużenie czasu osiągnięcia stanu równowagi. Oba te problemy można złagodzić przez podgrzewanie próbki. Wyższa temperatura ułatwia desorpcję analitów związanych z matrycą i przyspiesza transport analitów o małej lotności. Dodatkowo rośnie też stężenie analitów w fazie nadpowierzchniowej. Jednak ze wzrostem temperatury maleje wartość współczynnika podziału między fazę stacjonarną włókna a fazę nadpowierzchniową. Trzeba więc ustalić temperaturę optymalną, w której ilość wyekstrahowanego analitu jest największa.

Parametry wpływające na wydzielanie w technice SPME:

1. **Pokrycie włókna** – włókno w celu osiągnięcia dobrej selektywności i wydajności ekstrakcji analitów powinno charakteryzować się odpowiednimi właściwościami chemicznymi i fizycznymi. W pierwszym etapie wybór fazy stacjonarnej korzysta z zasady „podobne rozpuszcza się w podobnym”, czyli niepolarne anality są skuteczniej ekstrahowane do niepolarnego pokrycia włókna (PA), a polarne anality są ekstrahowane do polarnego pokrycia włókna (PDMS). Mieszane fazy są stosowane głównie do ekstrakcji bardzo lotnych związków. Wydajność ekstrakcji do takich włókien jest większa w porównaniu z PDMS, ale czas użytkowania generalnie krótszy. W tabeli 1 przedstawiono włókna dostępne w sprzedaży, ich własności i zastosowanie.

Tabela 1. Handlowo dostępne pokrycia włókien SPME: własności i zastosowania

Pokrycie włókna	Kolor włókna	Grubość filmu [µm]	Zalecane użycie	Zastosowanie
<i>WŁÓKNA NIEPOLARNE</i>				
Polidimetylosiloksan (<i>PDMS</i>)	czerwone	100	GC, HPLC	Niepolarne związki organiczne: lotne związki organiczne (ang. VOCs), wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (ang. PAHs; pl. WWA), benzen/toluen/etylobenzen/ksylen (BTEX), chloroorganiczne pestycydy
	żółte	30	GC, HPLC	
	zielone	7	GC, HPLC	
<i>WŁÓKNA POLARNE</i>				
Poliakrylan (<i>PA</i>)	białe	85	GC, HPLC	Polarne związki organiczne: tiazyny, fosfoorganiczne pestycydy, fenole
<i>WŁÓKNA MIESZANE</i>				
Polidimetylosiloksan- Diwinylobenzen (<i>PDMS-DVB</i>)	niebieskie brązowe	65 60	GC HPLC	Węglowodory aromatyczne, aromatyczne aminy, VOCs
Carboxen TM - Polidimetylosiloksan (<i>CAR-PDMS</i>)	czarne	75	GC	VOCs, węglowodory
Carbowax [®] -Diwinylobenzen (<i>CW-DVB</i>)	pomarańczowe	65	GC	Polarne związki organiczne: alkohole, ketony, nitroaromatyczne związki
Carbowax-Templated Resin (<i>CW-TR</i>)	purpurowe	50	HPLC	Anionowe surfaktanty, aromatyczne aminy
StableFlex TM Polidimetylosiloksan- Diwinylobenzen (<i>PDMS-DVB</i>)	niebieskie	65	GC	Węglowodory aromatyczne, aromatyczne aminy, VOCs
StableFlex TM Diwinylobenzen-Carboxen- Polidimetylosiloksan (<i>DVB-CAR-PDMS</i>)	szare	50/30	GC	Szeroki zakres polarnych analitów

2. **Grubość warstwy fazy stacjonarnej** jest niezmiernie ważna. Zastosowanie grubej warstwy fazy stacjonarnej powoduje, że układ znacznie dłużej osiąga stan równowagi. Należy wybrać włókno z najmniejszą grubością fazy stacjonarnej, która już zapewni wymaganą czułość. W tabeli 2 przedstawiono właściwości i zakres zastosowania włókien o różnej grubości warstwy fazy stacjonarnej.

Tabela 2. Właściwości i zakres zastosowania włókien z grubym i cienkim filmem fazy stacjonarnej

	Gruby film	Cienki film
Ilość sorbowanego analitu	większa	mniejsza
Właściwości	<ul style="list-style-type: none"> skuteczna ekstrakcja związków o wysokiej temperaturze wrzenia z matrycy próbki. szybkość desorpcji jest wówczas przedłużona i może być niecałkowita. 	zapewniona szybka dyfuzja i łatwe uwalnianie związków o wyższej temperaturze wrzenia podczas desorpcji termicznej
Zastosowanie	w szczególności do lotnych związków, gdyż zapewniają przeniesienie ich do GC bez znacznych strat	do izolacji i wzbogacania substancji o wysokiej temperaturze wrzenia

W tabeli 3 umieszczone są, zalecane przez producenta, warunki kondycjonowania poszczególnych włókien w przypadku analizy metodą kapilarnej chromatografii gazowej.

Tabela 3. Temperatura i warunki kondycjonowania włókien do SPME przy użyciu GC

Faza stacjonarna	Grubość filmu [µm]	Maksymalna temperatura [°C]	Zalecany zakres temperatur [°C]	Temperatura kondycjonowania [°C]	Czas kondycjonowania [h]
PDMS	100	280	200-270	250	0,5
	30	280	200-270	250	0,5
	7	340	220-320	320	1
PDMS-DVB	65	270	200-270	260	0,5
PA	85	320	220-310	300	2
CAR-PDMS	75	320	240-300	280	1-2
CW-DVB	65	265	200-260	250	0,5
DVB-CAR-PDMS	50/30	270	230-270	270	1

3. **Mieszanie:**

- najlepsze rezultaty daje mieszanie ultradźwiękowe,
- przy zastosowaniu mieszadła magnetycznego czas osiągnięcia stanu równowagi jest znacznie dłuższy,
- ułatwia dyfuzję składników z fazy ciekłej do fazy nadpowierzchniowej,
- polepsza dyfuzję przez powstającą wokół włókna cienką i nieruchomą warstwę wody, stanowiącą barierę dyfuzyjną dla analitów i powodującą wydłużenie czasu osiągnięcia stanu równowagi.

4. **Czas ekstrakcji** – najlepiej jeśli ekstrakcję prowadzi się do momentu osiągnięcia stanu równowagi pomiędzy próbką a fazą stacjonarną włókna.
5. **Temperatura** – może w dwojaki sposób wpływać na proces ekstrakcji (tabela 4):

Tabela 4. Korzystne i negatywne aspekty podwyższonej temperatury ekstrakcji

Korzystne	Negatywne
<ul style="list-style-type: none"> ○ powoduje wzrost szybkości ekstrakcji przez wzmożoną dyfuzję analitów w kierunku włókna 	<ul style="list-style-type: none"> ○ zmniejsza wartość współczynnika podziału analitów (K_{fs}), ponieważ etap absorpcji jest procesem silnie egzotermicznym
<ul style="list-style-type: none"> ○ pomagają przenieść anality do fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ dla termicznie niestabilnych związków tj. np. HMX podwyższona temperatura nie jest zalecana
<ul style="list-style-type: none"> ○ współczynnik dyfuzji w wodzie jest większy i czas ekstrakcji krótszy, ale współczynnik podziału włókno/próbka jest wówczas mniejszy 	<ul style="list-style-type: none"> ○ zmniejsza wartość współczynnika podziału między fazą stacjonarną a fazą nadpowierzchniową
<ul style="list-style-type: none"> ○ przyspiesza transport analitów o małej lotności 	

6. **Wysalanie:**

- przez dodanie soli wzrasta siła jonowa roztworu, co powoduje spadek rozpuszczalności wielu związków (przede wszystkim polarnych), a tym samym przesunięcie równowagi w kierunku fazy stacjonarnej,
- w przypadku związków niepolarnych wysalanie ma mały wpływ na wartość współczynnika podziału,
- efekt wysolenia zależy od rodzaju zastosowanej soli,
- wadą wysalania jest możliwość wprowadzania do badanej próbki dodatkowych zanieczyszczeń, jak również stopniowa degradacja fazy stacjonarnej osadzonej na włóknie – mikropęknięcia powstające pod wpływem soli, gdy włókno zanurzone jest w badanym roztworze.

7. **Zmiana pH** – w wyniku doboru odpowiedniego pH można cofnąć dysocjację wielu związków polarnych (np. fenoli), co powoduje, że stają się one mniej polarne i bardziej podatne na ekstrakcję przy użyciu słabo polarnej fazy stacjonarnej.

8. **Objętość próbki.**

Zakres materiału naukowego

1. Zasada mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME). Budowa urządzenia do SPME. Etapy procedury SPME. Parametry wpływające na efektywność wydzielania związków w SPME. Połączenie SPME z technikami rozdzielczymi.
2. Schemat i zasada działania chromatografu gazowego ze spektrometrem mas.

Literatura

1. Stepnowski P., Synak E., Szafranek B., Kaczyński Z. (2010) Techniki separacyjne. Wyd. UG, Gdańsk (dostępne online).
2. Witkiewicz Z., Kałużna-Czaplińska J. (2012) Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych. Wyd. WNT, Warszawa.

Aparatura i odczynniki

1. Chromatograf gazowy Agilent Technologies z detektorem MS i kolumną kapilarną HP-5MS (95% metylopolisiloksanu z 5% grup fenyłowych) 30m x 0,25 mm, 25 µm film fazy stacjonarnej,
2. Sprężone gazy: hel,
3. Urządzenie i włókno do SPME z warstwą 100 µm polidimetylosiloksanu (PDMS),
4. Pipeta automatyczna o poj. 10 µL, 10 mL,
5. Fiolki chromatograficzne o poj. 15 mL, kolby miarowe o poj. 250 mL (3 szt.),
6. Zlewki o poj. 100 mL (1 szt.), 250 mL (1 szt.).
7. Mieszanina wzorcowa BTEX (mieszanina benzenu, toluenu, etylobenzenu i p-ksylenu o stosunku objętościowym odpowiednio 7:3:2:2),
8. NaCl, KCl, KBr, czystości cz.d.a.,
9. Woda dejonizowana.

Sposób wykonania

Do kolby o pojemności 250 mL, zawierającej 36g NaCl, dodać 10 µL mieszanki BTEX i uzupełnić wodą do kreski. Z tak przygotowanego roztworu pobrać 8 mL i umieścić wraz z mieszadłkiem magnetycznym w naczyniu o pojemności 15 mL. Wydzielanie substancji należy przeprowadzać w temperaturze pokojowej w czasie 4 minut, bez mieszania.

Po zakończeniu każdego procesu SPME przeprowadza się analizę chromatograficzną przy użyciu aparatu GC-MS Agilent Technologies 6890N w następujących warunkach:

- kolumna HP-5MS (95% metylopolisiloksanu z 5% grup fenyłowych), 30 m×0,25 mm×25 µm,
- temperatura dozownika: 250°C,
- temperatura detektora: 250°C,
- przepływ gazu nośnego 1mL/min, podział strumienia gazu nośnego 1:20,
- czas termodesorpcji: 5 min,
- program temperaturowy: 50°C (2 min), narost 7°C/min do 80°C

Przeprowadzić następujące etapy optymalizacji warunków oznaczenia:

- A** – Wydzielanie substancji z roztworu badanego dla różnych warunków mieszania (bez mieszania oraz 200, 700 obrotów/min), przy niezmienionych pozostałych warunkach.
- B** – Dla wybranej intensywności mieszania przeprowadzić ekstrakcję, zmieniając jako parametr czas kontaktu włókna z fazą nadpowierzchniową (1 min, 4 min, 10 min).
- C** – Przeprowadzić wysalanie badanego roztworu poprzez dodatek NaCl, KCl, KBr w ilości 36 g na 250 mL roztworu badanego (każdą z soli należy dodawać pojedynczo do nowej porcji roztworu roboczego).
- D** – Ekstrahować substancje przy zmienionej objętości roztworu badanego (1, 5, 8 mL), zachowując pozostałe warunki.

Opracowanie wyników

Dla każdej z przeprowadzonych ekstrakcji podać warunki (czas pobierania próbki, intensywność mieszania, objętość próbki, dodatek soli) oraz otrzymane dla tych warunków czasy retencji t_R i pola powierzchni pików analizowanych substancji.

Określić wpływ intensywności mieszania, czasu pobierania próbki, dodatku soli, objętości fazy ciekłej na efektywność ekstrakcji.

Przedstawić wykresy przedstawiające zależność pól powierzchni oznaczanych związków od poszczególnych wartości optymalizowanych parametrów.

Przeprowadzić dyskusję otrzymanych wyników.