

Duna-víz extrahálható komponenseinek meghatározása GC-MSD rendszerrel

A gyakorlat az előző félévi kötelező analitika laborgyakorlat gázkromatográfiás laborjára épít. Az ott szerzett ismeretek a gyakorlat során a feleltetés részét képezhetik. Amennyiben az előző évi gyakorlatleírás nem áll rendelkezésére, az *ezzel a leírással együtt* megtalálható az alábbi weboldalon:

kendea.web.elte.hu

A gyakorlat helye: **601** labor, gyakorlatvezető: Angyal Vilmos, **kezdés: H 10.00, Sz 9.00**

Elméleti bevezető

1. A gázkromatográfia alapjai (emlékeztető az előző félévről)

A kromatográfiás eljárás célja valamely összetett elegy komponenseinek szétválasztása. Alapja a komponensek két fázis közötti ismételt megoszlása, az elválasztás a komponensek eltérő megoszlási hányadosa következtében jön létre. Más ismert megoszláson alapuló elválasztási folyamatoktól (folyadék-folyadék extrakció...) a kromatográfiás eljárások abban különböznek, hogy a két egymással nem elegyedő fázis közül az egyik mozgásban van (mozgófázis), míg a másik helyhez van kötve (állófázis). A gázkromatográfiában a mozgó fázis mindig gáz. Ha az állófázis szilárd adszorbens, akkor gáz-szilárd adszorpciós kromatográfiáról, ha folyadék, akkor gáz-folyadék megoszlási kromatográfiáról beszélünk. A gyakorlatban ez utóbbi a leggyakrabban alkalmazott. A folyadék állófázist vagy előzőleg egy inert felületű szemcsés anyagra juttatják, s az így nyert töltetet teszik a kolonnába (töltetes oszlop), vagy a kolonna belső falára viszik fel vékony filmként (kapilláris oszlop). A mai gyakorlatban főként kapilláris oszlopokat alkalmaznak, ezek átmérője 0,10; 0,18; 0,25; 0,32; 0,53 mm, filmvastagságuk 0,1-5,0 μm . Gázkromatográfiásan vizsgálhatók azok az anyagok, amelyek max. 400°C-on bomlás nélkül elpárolgathatóak.

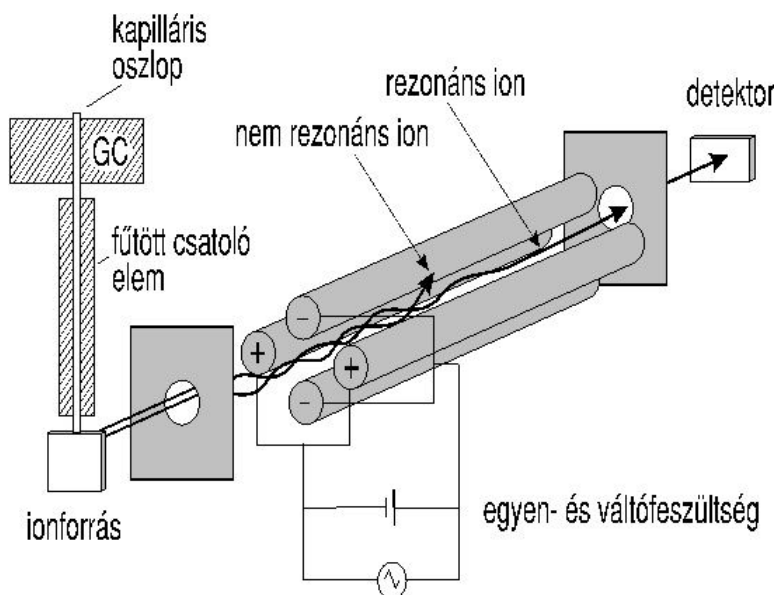
A gázkromatográf fő részei az injektor, az oszlop, a detektor, a gázrendszer, és az adatfeldolgozó rendszer. A vivógáz (mozgófázis vagy eluens) folyamatosan áramlik az

oszlopon, az injektor ebbe az állandó vivőgáz áramba juttatja be az elpárologtatott vizsgálandó mintát. A mérés közben a kolonna termosztált térben van elhelyezve. Aszerint, hogy a kolonna hőmérséklete állandó, vagy valamilyen program szerint változik, beszélünk izoterm, illetve hőmérsékletprogramozott gázkromatográfiáról. A hatékony elválasztás megkívánja, hogy a mintaadagolás pillanatszerű legyen. Ennek érdekében különböző injektortípusokat fejlesztettek ki (on column, split-splitless, programozottan fűthető).

Az injektálástól a detektálásig eltelt időt nevezzük az adott komponens retenciós idejének (t_R). Ennek az időnek egy részét az anyag a vivőgázban tölti, másik részét pedig a folyadékfilmben. Azok a komponensek, amelyek nem lépnek kölcsönhatásba a folyadékfázissal egyszerűen a vivőgázzal áthaladnak az oszlopon, áthaladási idejük a holtidő (t_0), amit a vivőgáz áramlási sebessége, a kolonna hőmérséklete és hossza határozza meg. A folyadékfázissal kölcsönhatásba lépő komponensek hosszabb-rövidebb időt töltenek a folyadékfilmben a megoszlási hányadosuknak (K) megfelelően, így jön létre az elválasztás. Ideális esetben a nagy sebességgel beinjektált minta komponensei csak nagyon szűk sávot töltenek ki a kolonnán és igen keskeny csúcsként detektálhatók. A gyakorlatban a kezdeti szűk sáv számos fizikai folyamat révén kiszélesedik. Ennek következtében ha két komponens retenciós ideje el is tér egymástól (különböző K érték) a diffúzió okozta átfedés miatt nem biztos, hogy a kolonna végéhez érve is teljesen el tudnak különülni. A megfelelő elválasztás érdekében az elválasztandó komponensek tulajdonságainak (polaritás, illékonyság...) és mennyiségének megfelelően kell kiválasztani az állófázist, az oszlop hosszúsát, átmérőjét, filmvastagságát.

A kolonnából kiáramló (eluálódó) anyagokat a detektor (pl. lángionizációs, hővezetőképességi, elektronbefogásos detektor, tömegspektrométer) folyamatosan érzékeli és a minta komponenseinek mennyiségével arányos jelet szolgáltat az idő függvényében. Az így nyert görbe a kromatogram.

2. Tömegspektrométer, mint gázkromatográfiás detektor



A tömegspektrométer univerzális és azonosító detektor, azaz minden olyan anyagra, ami a detektortérbe kerül, jelet ad, majd a válaszjel (tömegspektrum) alapján az egyes komponensek azonosíthatók is.

A tömegspektrométer részei:

- Transzfer line:

A kapillárisoszlop végső kb. 30 cm szakasza vezet át a gázkromatográfból a tömegszelektív detektor felé az ionforrásba. Ezt a szakaszt is termosztálni kell egy megfelelő hőmérsékletre azért, hogy a mérendő komponensek ne kondenzáljanak ezen a szakaszon. Ezt a fűthető segédeszközt nevezzük transzfer line-nak, mely hőmérséklete legalább akkora, mint a hőprogram végső szakasza (kb. 300 °C), de nem szabad felfűteni az oszlop maximális hőmérséklete fölé, hiszen akkor degradálódik ezen a részen a megosztófázis. Vivőgázként nem alkalmazható a H₂, mivel túl nagy a diffúziós állandója ahhoz, hogy a vákuumrendszer megbirkózzon vele, így MS detektoroknál nagy tisztaságú He-t használnak.

- Vákuumrendszer:

A tömegspektrométer nagyvákuumban működik, a legkisebb szabad úthossznak (mely jellemzi a vákuum nagyságát) akkorának kell lennie, hogy az ionforrásban keletkezett ionok a detektorig eljussanak más molekulával való ütközés nélkül. Elővákuumként rotációs szivattyút, végvákuumként diffúziós vákuumszivattyút, vagy turbomolekuláris szivattyút alkalmaznak.

- Ionforrás:

Az ionforrás az oszlopról eluálódó molekulák ionizációját végzi el. A leggyakrabban használt ionizációs technika (ezt használjuk a gyakorlaton is) az elektronütközéses ionizáció. Ennek során az oszlopról eluálódó molekulákat egy elektronsugár segítségével ionizáljuk. Az ütközés hatására keletkezhet molekulaion, mely csak töltésében tér el az eredeti molekulától, tömegében nem, valamint különböző fragmensek, melyek aránya jellemző az adott anyagra. A molekulaion és a fragmensek együtt szolgáltatják a vegyület tömegspektrumát. Mivel az elektronütközéses ionizáció erősen fragmentálja a molekulákat, gyakran a molekulaion nem is jelenik meg, ezért vannak olyan feladatok, melyekhez a lágyabb kémiai ionizációs (CI) technikát használják. Az elektronütközéshez hasonló módon létrehozott ionizált munkagázzal (metán) ütköztetjük az eluálódó molekulákat, így a molekulákra jóval kisebb energia adódik át, és nem fragmentálódnak jelentős mértékben a detektálásig. A tömegspektrum vonalszegény, azonban a molekulaion egyértelműen azonosítható.

A képződött ionokat egy precíziós ionoptika juttatja tovább az analizátor felé.

- **Analizátor:**

Az analizátor csak egy adott m/z értékű iont enged át egy adott időintervallumban a detektor felé. Működési elvüket tekintve sokféle analizátor-típus létezik, azonban alkalmazhatóságukat olyan paraméterek is megszabják, mint az ár, a méret vagy sebesség. A legelterjedtebb a kvadropól, a gyakorlaton használt készülék is ezzel rendelkezik. Az analizátor működési elve az, hogy 4 parabola-alakú fémtest van egy képzeletbeli négyzet alapú oszlop éleire elhelyezve, melyekre megfelelő potenciálokot kapcsolnak, továbbá két egymással szemben elhelyezkedő rúdpárra egy szinusz-potenciál. Ez a szinusz-potenciál határozza meg, hogy mely tömeg/töltésű ion haladhat át az analizátor tengelyével párhuzamosan a detektor felé.

- **Detektor (MSD):**

A detektor az analizátor által szűrt részecskét ion-elektron sokszorozóként elektromos jellé alakítja (egy beütés). Az egyes tömegszámoknál mért beütésszám adja a tömegspektrumot. Az ionizáció, tömeganalizálás és detektálás időigénye több nagyságrenddel kisebb, mint egy kromatográfiás csúcs elúciója, ezért egy csúcs elúciós ideje alatt is többször végigpásztázhatjuk (SCAN) az általunk választott tömegtartományt. Ez a detektor egyik adat-gyűjtési módja. Ebben az esetben az analizátor elektronikája a kvadropól megfelelő fémtesteire a kiindulási m/z -nek megfelelő szinusz-potenciált generál, majd a szinusz-potenciál mértékét megfelelően lépteti ahhoz, hogy egyesével növelje az analizátor m/z áteresztését, s így végigpásztázzuk egyesével az általunk meghatározott tömegtartományt (pl. 10 – 550 amu, atomic mass unit). Átlagos esetben 3-szor vesz fel az MSD teljes spektrumot 1 másodperc alatt, azaz egy SCAN felvétel ideje kb. 0,006 min., míg egy kromatográfiás csúcs alapvonalon mért szélessége átlagosan 0,02 min, így megfelelően gyors az MSD a kromatogram felvételéhez. A detektor másik adatgyűjtési módszere a szelektív ion monitorálás (SIM) üzemmód. Ebben az esetben ismernünk kell a merni kívánt molekulák retenciós idejét és jellemző fragmenseit a korábbi SCAN felvételek alapján. Ekkor a molekulánk retenciós ideje körül egy megfelelő szélességű időablakot választunk ahhoz, hogy a csúcs előtt és után

mérjük alapvonalat is a biztos integráláshoz. Ebben az időablakban maximum 4 m/z-t (fragment) követünk, ami a mérendő vegyületünkre jellemző, azaz a spektrum 4 legintenzívebb, karakterisztikus fragmentjét választjuk ki. Ezzel a módszerrel a detektorunk nagyjából 1-1,5 nagyságrend kimutatásihatár-növekedést ér el, azonban a minőségi kiértékelésünk biztonsága valamelyest csökken a SCAN üzemmódhoz képest. Amikor egy adott molekula retenció ideje körül vizsgáljuk a jellemző fragmentjeket, a módszer minőségi azonosítását az egyes fragmentje aránya biztosítja. MSD detektálásnál vegyület teljes elválasztása nem szükséges abban az esetben, ha a jellemző ionjaik különbözőek.

3. Adatgyűjtés, kiértékelés

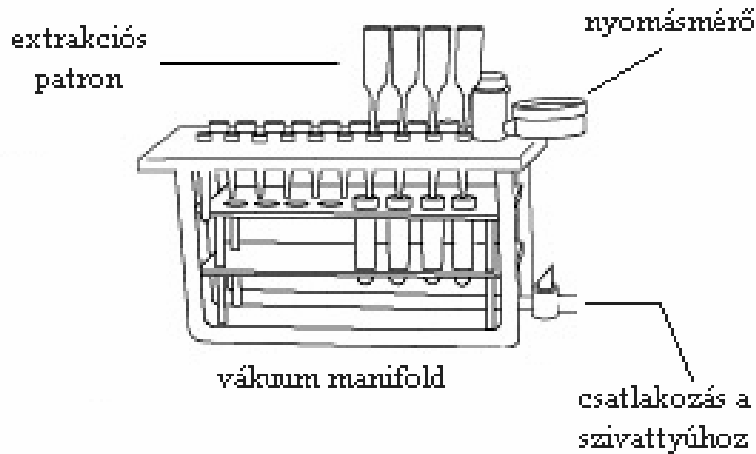
A készülék vezérlése és az adatgyűjtés teljes mértékben számítógéppel történik. A felvett kromatogram (TIC, Total Ion Chromatogram) lényegében 3 dimenziós. Az x tengelyen az adott időpillanathoz tartozik egy tömegspektrum, mely nem mint z tengely jelenik meg, hanem az y tengelyen mint az összes vizsgált m/z beütések összege. Így jön létre az ábrázolt kromatogram (TIC). A minőségi kiértékelés a kiválasztott csúcs tömegspektruma alapján történik, melyet egy adatbázissal hasonlítunk össze. A mennyiségi kiértékelés alapja pedig a legjellemzőbb fragmention csúcsterülete.

4. Minta-előkészítés

A szilárd fázisú extrakció (SPE) egy kis hatékonyságú oszlopkromatográfias technika. A vízmintát egy szilárd halmazállapotú, szemcsés tölteten vezetik át, ahol a kiválasztott töltet felületi csoportjai a dúsítani kívánt komponensekkel kölcsönhatásokat alakítanak ki, így megakadályozzák, hogy a szilárd fázisról az adott komponensek távozzanak. Nagy mennyiségű vízminta átengedésével jelentős dúsítás érhető el. A különböző analitikai eszközöket gyártó cégek többféle minőségű és kapacitású adszorbenst forgalmaznak. A leggyakoribbak az apoláris vagy poláris csoportokkal módosított szilikagél töltetek és az ioncserélő gyanták. Az apoláris – fordított fázisú – töltetek C2-, C4-, C6-, C8-, C18-, ciklohexil- vagy fenil-csoporttal módosított szilikonok. A normál fázisú és az ioncserélő tulajdonságú töltetknél ennél nagyobb a változatosság. Összetett analitikai feladatok megoldására kevert vagy egy adott vegyületcsaládra specifikus töltött oszlopok is rendelhetők. A szénhidrogének meghatározására alkalmas adszorbensek apoláris, leggyakrabban oktil- vagy oktadecil-csoportokkal (aromásoknál fenil) módosított szilikagél fázist tartalmaznak. A geometriai megvalósítást tekintve két változata terjedt el az oszlopos vagy patronos (cartridge) és a diszkes megoldás. Az oszlop vagy patron egy 1-70 ml-es üveg vagy polietilén cső, amelyben a szemcsés töltetet két tartóréteg között helyezik el. A töltet mennyisége 25mg-tól 10g-ig terjed és a szemcseméret 30-60mm.

A szilárd fázisú extrakció főbb munkafázisai a kondicionálás, ekvibrálás, mintafelvitel, mosás, szárítás és a leoldás (elúció). A kondicionáláskor a töltet felületi csoportjait megfelelő oldószer átengedésével alkalmassá teszik a kívánt kölcsönhatások kialakítására és az oszlop mintával való nedvesíthetőségét megnövelik. Az ekvibrálás során a mintához hasonló szervesanyag-mentes vizet engedünk át, felkészítjük a töltetet a minta fogadására. Eközben állíthatjuk be szükség esetén a vizsgálandó minta pH-ját, apoláros jellegét (pl. MeOH hozzáadásával). A mintafelvitel során az oszlopon átáramló mintából megkötődnek a dúsítandó komponensek. A mosás a nemkívánatos mátrixkomponensek eltávolítását szolgálja. Fontos, hogy a munkafázisok során az oszlopon folyamatosan legyen folyadék, mert ha levegő kerül az oszlopra, akkor a továbbiakban már nem lesz megfelelő a nedvesítés. A szárítás során nagyrészt eltávozik az eredeti oldószer maradéka az oszlopról, majd az elúció során a vizsgált komponenseket alkalmas oldószer kis mennyiségével szelektíven leoldódnak. Az oszlopon való áthaladási sebességet vákuum segítségével lehet szabályozni.

A módszer előnye, hogy kevés oldószert igényel, valamint egy lépésben megtörténik az extrakció, a tisztítás és a dúsítás is, ezáltal időigénye is kisebb. A kiindulási és a végtérfogattól függően, akár 50-300-szoros dúsítás is lehetséges. A módszer megvalósítása az alábbi ábrán látható:



Gyakorlati rész

A gyakorlat célja, hogy megismerkedjeteK egy napjainkban használatos modern GC-MSD rendszer kezelésével, használatával, mérési módszereivel, a kapott kromatogram kiértékelésével. A feldolgozott minta a gyakorlat során Duna-víz, melyet szilárd fázisú extrakciós módszerrel készítünk elő, és az extraktum komponenseit GC-MSD rendszerrel elválasztjuk, azonosítjuk.

1. Minta-előkészítés:

A gyakorlat során kétszer 100 ml Duna-vizet dolgozunk fel, melyekhez annyi MeOH-t adunk, hogy a minta 2 %-os MeOH tartalmú legyen. Az analizálandó mintákat az előkészített IST C18 500 mg-os SPE patronon tisztítjuk és koncentrálnjuk.

A szilárd fázisú extrakció menete:

- Kondicionálás: 10 cm³ MeOH, 10 ml/min
- Ekvilibrálás: 10 cm³ csapvíz, 2% MeOH, 10ml/min
- Mintafelvitel: 100 cm³, 25ml/min
- Mosás: 10 cm³ csapvíz, 2% MeOH, 10ml/min
- Szárítás: 5 min, levegő átszívás (minimális nyomáson)
- Leoldás: 3 cm³ hexán

2. Műszeres mérés:

A Duna-víz extrahálható komponenseinek meghatározását GC-MSD-vel végezzük el a leírásban szereplő körülmények mellett.

- GC: Agilent 6890N
- MSD: Agilent 5793N (solvent delay: 4 min)
- Vívógáz: He (tisztaság: 5.0)
- Áramlási sebesség: 1,4 ml / min
- Oszlop: HP-5 30mx0,25 mm 0,25 µm filmvastagság
- Detektor: MSD, 300 °C transzfer line
- T(injektor): 250 °C /splitless, 1,5 min/
- Hőmérsékletprogram: 40 °C (2perc) → 10 °C/perc → 300 °C (5 perc)
- Injektált mennyiség: 2 µl

- Adatgyűjtés / feldolgozás: Agilent MSD Chemstation

3. Jegyzőkönyv:

A jegyzőkönyv tartalmazza a gyakorlaton elvégzett minta-előkészítést, a gázkromatográfiás körülményeket, gyakorlaton rögzített kromatogramokat és a tömegspektumokat.

- Írd le a SCAN és SIM adatgyűjtési módszerek lényegét és hasonlítsd össze őket mind mérés, mind kiértékelés szempontjából. Milyen feladatra milyen technika alkalmas?
- Hányszoros dúsítást hajtottunk végre a szilárdfázisú extrakció során?
- Táblázatosan foglald össze a Duna-vízből kimutatott komponenseket (név, jellemző fragmensek, retenciós idő, csúcsterület).