

Zadanie 3.

Zastosowanie chromatografii gazowej z detektorem wychwytu elektronów w analizie chlorowcopochodnych związków organicznych w próbkach biologicznych

1. Wiadomości ogólne

Chlorowcopochodnymi związków organicznych (związkami halogenoorganicznymi) określa się związki organiczne zawierające w cząsteczce atomy chloru, bromu lub jodu. Są one szeroko stosowane w przemyśle i rolnictwie i bywają często przyczyną skażeń wód, gleby i atmosfery. Przez środowiska, ale i na skutek działania bezpośredniego mogą być powodem zatruć. Spośród substancji halogenoorganicznych najliczniejszą grupę stanowią związki chloroorganiczne, a wiele z nich zaliczanych jest do niebezpiecznych substancji organicznych. Związki chloroorganiczne obecne w środowisku można podzielić, w zależności od ich właściwości, na:

- lotne związki chloroorganiczne,
- pestycydy,
- chlorofenole,
- polichlorowane bifenyle (PCB),
- polichlorowane dibenzo-p-dioksyny (PCDD) i dibenzofurany (PCDF).

Lotne związki chloroorganiczne stanowią grupę substancji o krótkich łańcuchach węglowych. Typowymi przedstawicielami są dichlorometan, trichlorometan (chloroform), tetrachlorometan, trichloroetylen, tetrachloroetylen oraz freony. Są one wykorzystywane w przemyśle jako rozpuszczalniki, zmiękczacze, płyny czyszczące, półprodukty, środki chłodzące. W procesie oczyszczania wody, w wyniku reakcji substancji organicznych z chlorem, powstają uboczne produkty dezynfekcji. W skład tej grupy wchodzi zarówno lotne, jak i nielotne związki halogenoorganiczne.

Pestycydy to liczna i zróżnicowana grupa związków chemicznych, ich zastosowanie celnie określa nazwa powstała z połączenia dwóch łacińskich słów *pestis* – szkodnik i *cedeo* – niszczyć. Pestycydy stanowią grupę zanieczyszczeń środowiska bardzo często występujących w wodach powierzchniowych i gruntowych. Największe ich stężenia stwierdza się w okresie spływu wód roztopowych oraz wykonywania zabiegów agrochemicznych. Ważną drogą transportu pestycydów są opady atmosferyczne, za pośrednictwem których zanieczyszczeniu ulegają zbiorniki wodne znajdujące się w dużej odległości od terenów rolniczych. Wybór sposobu przygotowania próbek zależy od postaci próbki, rodzaju matrycy i analitów oraz dostępnych metod instrumentalnych. Sposób pobierania próbek wody w dużym stopniu zależy od składu chemicznego zanieczyszczeń wody i celu analizy. Pestycydy stanowiące największe zagrożenie to aldryna, dieldryna i epoksyd heptachloru. Stężenia pestycydów w wodach 0,001 µg/l nie są zagrożeniem. NSD dla sumy wszystkich pestycydów (obejmuje wszystkie oznaczone w analizie pestycydy) wynosi 0,50 µg/l. Określa to dyrektywa, która powinna być wdrożona do stosowania w listopadzie 2003 roku. Problem zagrożenia pestycydami fauny i flory wód powierzchniowych jest na tyle skomplikowany, że dotychczas opracowano na ten temat bardzo mało norm i przepisów prawnych. Polskie przepisy dotyczą jakości wód powierzchniowych i obejmują tylko trzy grupy pestycydów:

- insektycydy z grupy węglowodorów chlorowcoorganicznych - 0,05 µg/l,
- insektycydy fosforoorganiczne i karbaminianowe - dopuszczalne stężenie 1,0 µg/l.

Herbicydy są to pestycydy stosowane do zwalczania chwastów. Ze względu na sposób działania herbicydy dzieli się na kontaktowe i systemiczne. Herbicydy kontaktowe niszczą rośliny w wyniku bezpośredniego kontaktu. Herbicydy systemiczne mają łagodniejsze działanie, są wchłaniane przez liście lub korzenie. Ze względu na budowę chemiczną herbicydy dzieli się na:

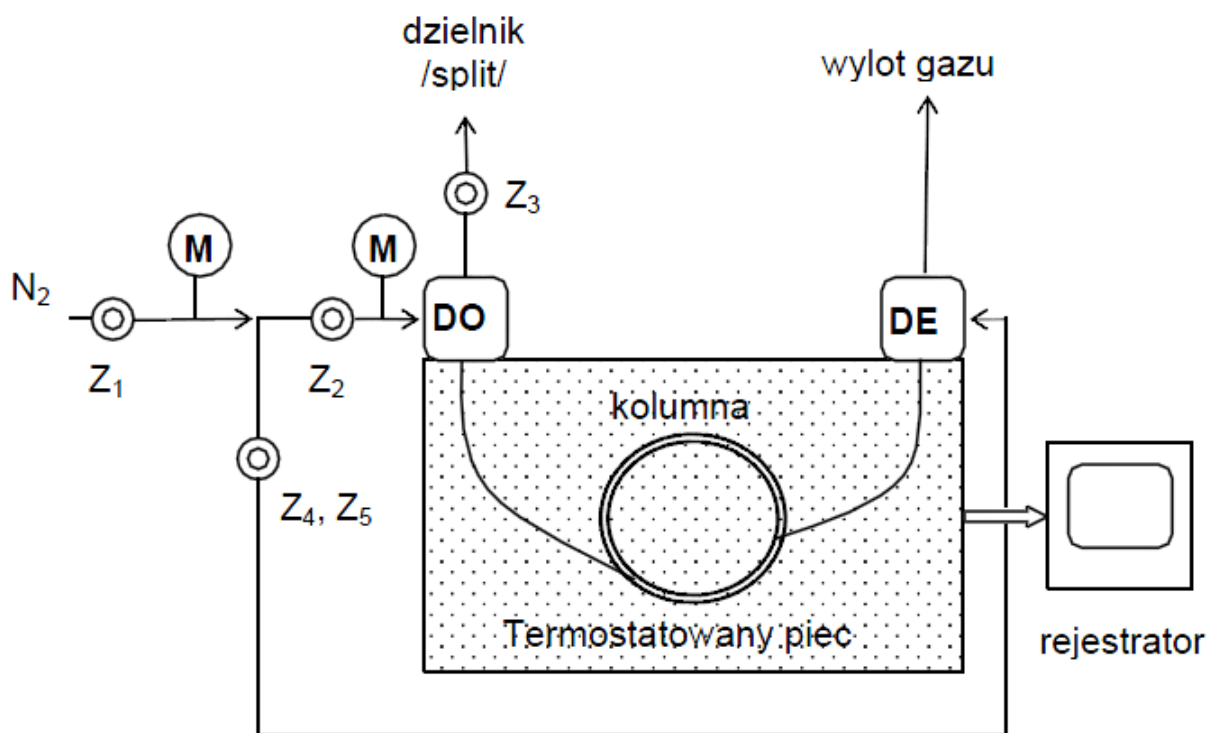
- karboksylowe pochodne aromatyczne
- pochodne kwasów alifatycznych
- podstawione fenole
- heterocykliczne pochodne azotowe

- alifatyczne pochodne azotowe.

2. Ogólne zasady działania chromatografu gazowego

Chromatografia gazowa jest wysokosprawną metodą rozdzielania mieszanin lotnych związków umożliwiającą ich jakościowe i ilościowe oznaczanie. Ideowy schemat chromatografu gazowego, wyposażonego w kolumnę kapilarną i detektor wychwyty elektronów (ECD) przedstawiono na rysunku poniżej.

Analizowana próbka rozcieńczona w odpowiednim rozpuszczalniku (lekki alkan C6-C8) jest wprowadzana za pomocą mikrostrzykawki do dozownika chromatografu, w który następuje jej odparowanie i wprowadzenie w strumień azotu płynącego bez przerwy przez układ analityczny chromatografu. Wraz ze strumieniem azotu próbka w stanie gazowym wpływa do kolumny chromatograficznej. Ponieważ, nawet precyzyjna mikrostrzykawka nie pozwala aplikować odpowiednio małej ilości analizowanego roztworu, wymaganej przy pracy z kolumnami kapilarnymi, dozownik wyposażony jest w mechanizm dzielenia strumienia (split) pozwalający pobrać do kolumny tylko, np. 1/100 część objętości odparowanej próbki – 99/100 części wypuszczane jest na zewnątrz. Kapilarna kolumna chromatograficzna jest to cienka kapilarna rurka, o długości zwykle kilkudziesięciu metrów z odpowiednio przygotowaną powierzchnią wewnętrzną, pokrytą termostabilną fazą organiczną o precyzyjnie dobranych właściwościach fizykochemicznych, w tym



Z1 - zawór regulacyjny gazu nośnego (carrier pressure), poziom ciśnienia, ustawiony tym zaworem limituje przepływ przez detektor dodatkowego strumienia azotu omywającego anodę

Z2 - zawór regulujący ciśnienie azotu na wlocie kolumny (column head pressure), a tym samym wielkość przepływu przez kolumnę

Z3 - zawór regulujący wypływ gazu przez dzielnik (split)

Z4, Z5 - zawory odcinające przepływ „dodatkowych strumieni azotu (aux gas, anode purge) przez detektor, zamknięcie ich umożliwia pomiar przepływu gazu przez kolumnę

DO - dozownik

DE – detektor

polarności. Właśnie oddziaływanie pomiędzy przepływającymi wraz z gazem nośnym parami rozdzielanych substancji, a aktywną fazą kolumny leży u podstaw ich separacji. Związki o dużym

powinowactwie do fazy aktywnej kolumny oraz wysokowrzące z natury przemieszczają się wzdłuż kolumny wolniej. Skuteczności rozdzielania chromatograficznego sprzyjają odpowiednio dobrane:

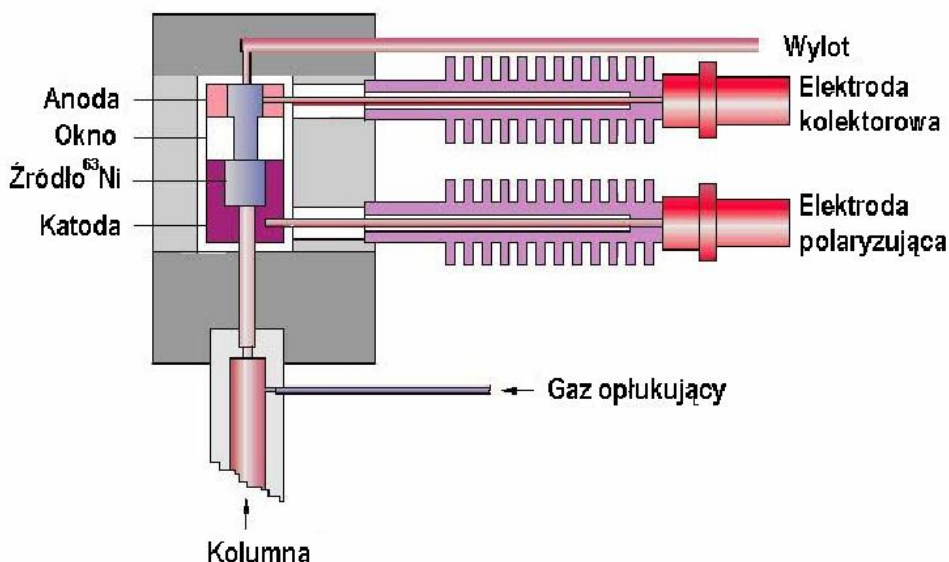
- długość i średnica kolumny
- rodzaj i grubość fazy aktywnej kolumny
- program temperaturowy
- szybkość przepływu i rodzaj gazu nośnego w kolumnie

Oczywiście każdy z tych parametrów ma istotne ograniczenia, nie można np. prowadzić analiz w warunkach termicznej destrukcji analizowanych substancji lub niszczących samą kolumnę.

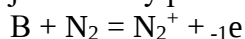
Substancje opuszczające kolumnę trafiają do detektora. Detektor ECD specyficznie reaguje na obecność związków zawierających pierwiastki elektrono-akceptorowe. Węglowodory alifatyczne praktycznie „nie są widziane” przez taki detektor. Stąd szerokie zastosowanie detektorów ECD do oznaczania związków chlorowcoorganicznych (PCB, pestycydy).

2.1. Detektor wychwytu elektronów ECD.

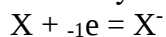
Jest detektorem selektywnym. Sygnały w detektorze ECD pojawiają się w wyniku gwałtownego spadku natężenia prądu płynącego w komorze jonizacyjnej po dostaniu się do niej substancji o dużym powinowactwie elektronowym. Poniżej przedstawiono schemat takiego detektora.



W komorze detektora znajduje się źródło promieniowania β (folia z ^{63}Ni), katoda oraz elektroda zbiorcza – anoda. Gaz nośny, którym jest bardzo czysty azot lub mieszanina argonu z metanem jest jonizowany przez cząstki β , emitowane ze źródła, zgodnie z równaniem:



Jony dodatnie i elektrony „zbierane są przez elektrody. W ten sposób tworzy się prąd tła. Wprowadzone do komory związki o dużym powinowactwie elektronowym, wychwytyują wolne elektrony według równania:



Jony X^- , rekombinują z dodatnimi jonami gazu nośnego N_2^+ , powodując spadek prądu tła. Detektor charakteryzuje się dużą czułością w stosunku do związków halogenoorganicznych (zawierające fluor, chlor, brom lub jod). Poziom detekcji jest rzędu 10^{-14} g Cl na cm^3 gazu nośnego.

3. Oznaczenia 1,2-dibromoetanu w próbce powietrza metodą GC-ECD

Warunki pracy chromatografu:

- temperatura dozownika: 240⁰C
 - temperatura detektora: 300⁰C
 - przepływ gazu nośnego (azotu) przez kolumnę: 1 ml/min (100 kPa)
 - przepływ dodatkowego gazu nośnego (azotu) przez detektor: 40 ml/min
 - program temperaturowy pieca: 60⁰C(1min), 20⁰C/min → 120⁰(3 min),
 - kolumna: HP-5, długość – 30m, średnica 0,25mm, film 0,25 µm
 - objętość nastrzyku: 1µl (split 1:20)
- Czas analizy wynosi około 10 min.

Wykonanie oznaczenia:

Zadanie polega na określeniu ilości 1,2-dibromoetanu (DBE) obecnego w próbce powietrza. Do tego celu wykorzystany zostanie chromatograf gazowy z detektorem wychwytu elektronów (ECD) firmy Shimadzu. Powietrze skażone chlorowcopochodną uzyskane będzie przez wprowadzenie określonej ilości odczynnika do szklanej butelki o pojemności 350 ml z gumowym korkiem. Stężenie DBE w próbce powietrza zostanie wyliczone na podstawie krzywej wzorcowej otrzymanej przez analizę odpowiednich rozcieńczeń 1,2-dibromoetanu w heksanie. Rozcieńczenia DBE przygotowujemy za pomocą pipety automatycznej w szklanych fiolkach o pojemności 2 ml z zakrętką. Roztwór wyjściowy zawiera 10 µg 1,2-dibromoetanu w 1 ml heksanu. Kolejne rozcieńczenia to 0.1 ng/µl, 0.05 ng/µl, 0.01 ng/µl. Przygotowujemy je poprzez odpowiednie rozcieńczanie heksanem roztworów wyjściowych.

Pomiary rozpoczynamy od analizy chromatograficznej rozpuszczalnika czyli heksanu*. Analizy roztworów wzorcowych do krzywej wykonujemy w kolejności od najniższego do najwyższego stężenia, aplikując za każdym razem do aparatu GC-ECD po 1 µl roztworu (nie przepłukując w międzyczasie strzykawki).

Po wykonaniu wszystkich analiz strzykawkę należy 10 krotnie przepłukać heksanem. Oznaczenie zawartości 1,2-dibromoetanu w próbce powietrza zostanie przeprowadzone przez aplikację do aparatu 100 µl powietrza pobranego przez gumowy korek z butelki za pomocą gazoszczelnej mikrostrzykawki. Pliki kolejnych analiz oznaczamy w sposób następujący: 1Hex – dla heksanu; 1DB100, 1DB050, 1DB010 – dla kolejnych rozcieńczeń 1,2-BDE; 1DBPOW – dla próbki powietrza (pisanie rozszerzenia pliku nie jest konieczne). Pliki zapisujemy w katalogu: C:\CHROMA\ANALIZY\B_SAD\Zesp_M-N, gdzie: M oznacza nr grupy w kolejności odbywania ćwiczeń, a N nr zespołu w danej grupie.

Ilość 1,2-dibromoetanu w próbce powietrza obliczymy na podstawie powierzchni piku i krzywej wzorcowej wykreślonej na podstawie powierzchni pików roztworów wzorcowych.

* Analizy GC-ECD i odczytanie powierzchni pików prowadzimy w oparciu o osobną instrukcję.

Zadanie 3. Zastosowanie chromatografii gazowej z detektorem wychwyty elektronów w analizie chlorowcopochodnych związków organicznych w próbkach biologicznych

Imiona i nazwiska autorów:

Zespół nr:

1.

2.

3.

Wyniki:

Stężenie DBE	0.1 ng/μl	0.05 ng/μl	0.01 ng/μl	
Powierzchnia piku [μV/s]				
Powierzchnia piku próbki powietrza:		Stężenie DBE w powietrzu:	 ng/100μl	 μg/350ml

Krzywa wzorcowa i wynik pomiaru zawartości DBE w powietrzu

