

Wydział Chemiczny
Zakład Materiałów Polimerowych i Węglowych
Politechnika Wroclawska

Laboratorium: CHROMATOGRAFIA GAZOWA

**OZNACZANIE WIELOPIERŚCIENIOWYCH
WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH W PRÓBKACH
GRUNTU METODĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ
SPRZĘŻONEJ Z SPEKTROMETRIĄ MAS (GC-MS)**

CHEMIA ANALITYCZNA

Opracowała: Grażyna Gryglewicz

Wrocław 2007

I. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA)

1. Źródła emisji do środowiska naturalnego

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne zawierają od 2 do kilkunastu podstawionych lub niepodstawionych, sprzężonych pierścieni aromatycznych. Są obecne w produktach ubocznych niepełnego spalania i przeróbki paliw, głównie ropy naftowej oraz węgla. Niektóre z nich powstają w procesach biosyntezy u roślin i bakterii.

Naturalne źródła pochodzenia tych związków to: pożary lasów, wypalania stepów, erupcje wulkanów.

Antropogeniczne źródła, które są głównym źródłem zanieczyszczenia środowiska związkami WWA to: przemysł koksowniczy, hutniczy, elektrociepłownie, produkcja a następnie ścieranie się gum i asfaltów, pojazdy mechaniczne zwłaszcza samochody z silnikami wysokoprężnymi. Z pyłów zawartych w spalinach tych silników wyekstrahowano kilkadziesiąt różnych WWA, m.in. benzo(a)piren - 0,2 µg/g pyłu, fenantren - 55 µg/g pyłu, fluoranten - 44 µg/g pyłu, chryzen - 13 µg/g pyłu. Emisja WWA do atmosfery pochodzi także z gospodarstw domowych czy spalania odpadów. Natomiast dodatkowe zanieczyszczenie wód i gleb może być efektem wycieków ze zbiorników z ropą naftową oraz katastrof związanych z transportem tego paliwa.

2. Charakterystyka ogólna

WWA są ciałami krystalicznymi. Charakteryzują się wysokimi temperaturami topnienia i niskimi prężnościami par. Mają charakter aromatyczny i są związkami niepolarnymi. W obecności światła i tlenu ulegają reakcji fotochemicznej z utworzeniem dioli, chinonów i aldehydów. Dobrze rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych, natomiast słabo w wodzie. Obecność innych związków organicznych zwiększa rozpuszczalność WWA w wodzie.

WWA wykazują duże powinowactwo do powierzchni ciał stałych w związku z czym uważa się iż, występują głównie w postaci zaadsorbowanej na powierzchni stałych cząstek zarówno w wodzie, glebie jak i w powietrzu.

3. Toksyczność

W biocenozie istnieją gatunki posiadające enzymy pozwalające wykorzystać WWA jako źródła węgla i energii. Są to organizmy odporne na szkodliwe działanie

wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. W zdecydowanej większości przypadków obecność WWA wpływa niekorzystnie na organizmy. Związki te charakteryzuje *toksyczność chroniczna*. Oznacza to, iż pojedyncza duża dawka nie jest szkodliwa, dopiero długotrwałe, regularne pobieranie niewielkich dawek może być przyczyną chorób. WWA zaliczane są do związków mutagennych i rakotwórczych. Jednakże same WWA nie wykazują aktywności kancerogennej, dopiero ich pochodne, powstające w wyniku działania enzymów metabolicznych są związkami kancerogennymi.

Ponieważ związki te są dobrze rozpuszczalne w tłuszczach, łatwo przenikają przez błony kumulując się w komórkach tłuszczowych. Efektem tego jest zakłócenie wielu procesów komórkowych.

Oddziaływanie WWA uzależnione jest nie tylko od organizmu żywego, ale głównie od rodzaju i stężenia związku oraz obecności innych WWA. Wykazano, iż piren bardzo wzmaga szkodliwe działanie benzo(a)pirenu. Do grupy najbardziej kancerogennych zaliczono benzo(a)piren, dibenzo(a,h)antracen, benzo(b)fluoranten.

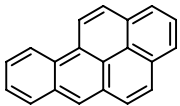
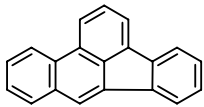
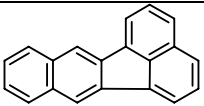
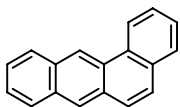
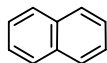
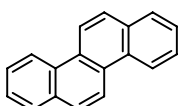
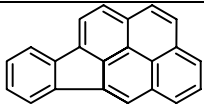
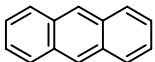
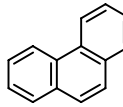
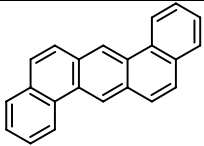
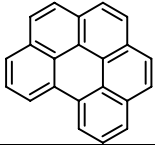
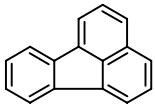
4. Regulacje prawne

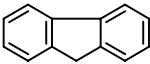
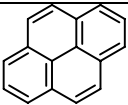
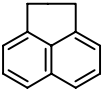
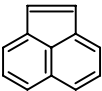
Liczne WWA już od wielu lat są znane jako związki niebezpieczne. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) już w 1970 r. wprowadziła ustalenie, że sumaryczne stężenie WWA w wodzie nie powinno przekroczyć 200 ng/dm³, a stężenie **benzo(a)pirenu** w wodzie do picia nie może być większe niż **10 ng/dm³**.

Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (EPA) w 1976 r. sporządziła listę niebezpiecznych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, na której znalazło się aż 16 węglowodorów, Tabela 1.

W Polsce pierwsze regulacje prawne odnośnie WWA zostały stworzone w 1980 r. Było to rozporządzenie Rady Ministrów określające dopuszczalne stężenie benzo(a)pirenu, które nie powinno być wyższe niż 50 ng/dm³. W 1990 wyszło rozporządzenie Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej dopuszczające w wodzie do picia i na potrzeby gospodarcze **15 ng/dm³ benzo(a)pirenu** (porównaj z WHO).

Tabela 1. WWA zamieszczone na liście EPA(++++bardzo toksyczne, - brak, ? nie udowodnione)

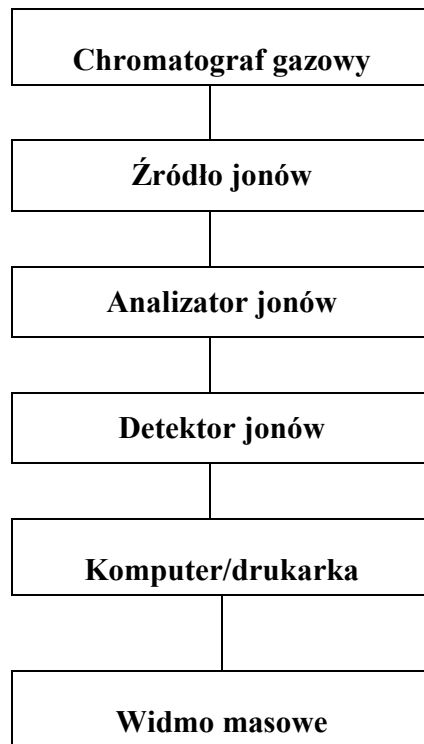
Związek	Struktura	Względna rakotwórczość	Występowanie wybranych WWA
Benzo(a)piren		++++	Produkt spalania paliw, pak węglowy, powietrze, dym papierosowy, osady, rośliny
Benzo(b)fluoranten		+++	Woda, powietrze, spaliny silnikowe
Benzo(k)fluoranten		++	Spaliny silnikowe, powietrze, dym papierosowy
Benzo(a)antracen		?	Smoła węglowa
Naftalen		?	Smoła węglowa
Chryzen		+	Powietrze, woda, żywność, spaliny samochodowe, dym papierosowy, spalanie węgla, olejów opałowych, smoła węglowa
Indeno(1,2,3-cd)piren		++	Spaliny silnikowe, powietrze, żywność, dym papierosowy,
Antracen		?	Smoła węglowa
Fenantren		?	Smoła węglowa
Dibenzo(a,h)antracen		++++	
Benzo(ghi)-perylene		+	Spaliny silnikowe, powietrze, żywność, dym papierosowy, rośliny
Fluoranten		+	Spaliny silnikowe, woda, osady żywność, dym papierosowy

Związek	Struktura	Względna rakotwórczość	Występowanie wybranych WWA
Fluoren		?	Smola węglowa
Piren		-	Smola węglowa
Acenaften		?	
Acenaftylen		?	Smola węglowa

II. Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas

Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC/MS) jest połączeniem dwóch zaawansowanych technik instrumentalnych do analizy związków organicznych. Metoda GC/MS jest najefektywniejszą metodą identyfikacji i oznaczeń śladowych ilości lotnych związków organicznych w złożonych matrycach naturalnych. Służy do oznaczania związków organicznych w materiałach biologicznych, żywności, lekach, wodzie i powietrzu. Szeroko jest stosowana w laboratoriach zajmujących się monitorowaniem zanieczyszczeń środowiska.

W układzie GC/MS chromatograf gazowy służy do rozdzielania analizowanej mieszaniny na składniki w czasie, a spektrometr mas rejestruje ich widma masowe, na podstawie których każdy ze składników rozdzielonej mieszaniny można zidentyfikować. Schemat blokowy układu GC/MS przedstawiono na Rys. 1.



Rys. 1. Ogólny schemat działania chromatografu gazowego ze spektrometrem mas

Wprowadzenie próbki do spektrometru mas odbywa się za pośrednictwem **chromatografu gazowego**. Narzuca to jednak pewne ograniczenia. Analizie może być poddana tylko taka substancja, która w warunkach pracy chromatografu odparuje nie ulegając termicznej destrukcji, bo otrzymane widmo masowe będzie widmem produktów jej rozkładu.

Rozdzielone w chromatografii gazowej składniki mieszaniny są kolejno wprowadzane w fazie gazowej do **źródła jonów** (komory jonizacyjnej), gdzie cząsteczki związków ulegają jonizacji i rozpadowi na naładowane fragmenty. Jest to więc proces destrukcyjny i nie otrzymujemy z powrotem substancji wyjściowej. Dla cząsteczki związku organicznego jonizację można przedstawić następująco:

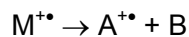


gdzie kropki (M:) oznaczają wolną parę elektronową lub orbital wiążący, a M^{+} nazywa się **jonem molekularnym**, o ładunku dodatnim z i masie m . Utworzony jon molekularny, który jest kationorodnikiem o nieparzystej liczbie elektronów, ma masę cząsteczkową praktycznie równą masie cząsteczkowej badanego związku. Jon molekularny przejmuje znaczną część energii kinetycznej jonizującego elektronu, co prowadzi do procesów jego rozpadu. Procesy

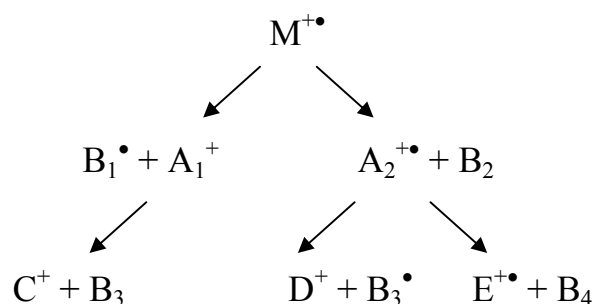
te noszą nazwę **fragmentacji**. Jon molekularny może ulec rozpadowi na fragmenty tworząc kation parzystoelektronowy i rodnik



lub nowy kation rodnikowy i obojętną cząsteczkę.

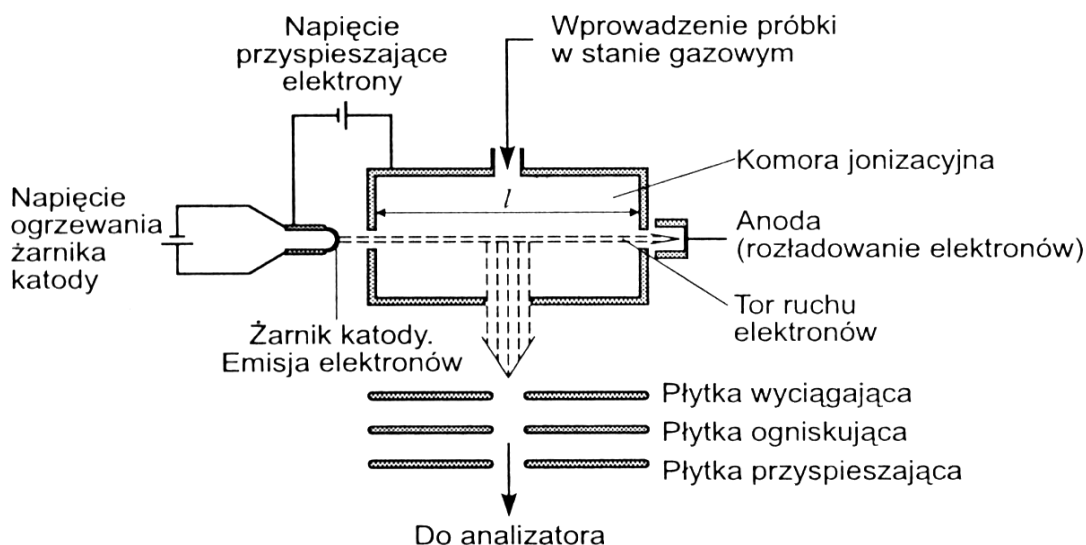


Każdy z pierwotnych jonów fragmentacyjnych, utworzonych bezpośrednio z jonu molekularnego, może z kolei ulegać dalszej fragmentacji, na przykład:



Te wtórne procesy fragmentacji prowadzą w efekcie do powstania z cząsteczki wielu jonów, rodników i cząsteczek obojętnych. W wyniku fragmentacji uzyskuje się ostatecznie charakterystyczny dla danego związku zestaw jonów o różnym stosunku masy do ładunku m/z .

Najczęściej stosowaną metodą jonizacji w analizie związków organicznych jest jonizacja strumieniem elektronów (EI-MS). W metodzie tej cząsteczki analizowanej substancji w postaci gazowej są bombardowane strumieniem elektronów emitowanych przez katodę i przyspieszanych w kierunku anody (pułapki elektronowej) na skutek różnicy potencjałów pomiędzy elektrodami (Rys. 2).



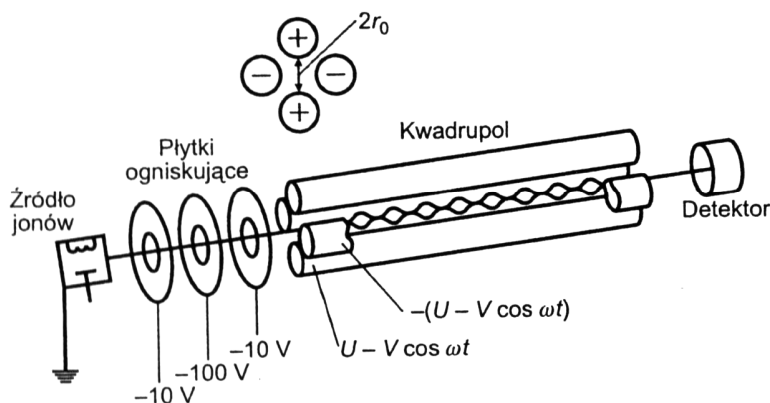
Rys. 2. Schemat źródła jonów z jonizacją strumieniem elektronów.

Strumień elektronów zderza się w źródle z cząsteczkami w fazie gazowej. Jeżeli zostanie przekazana wystarczająca ilość energii, to może nastąpić wybite elektronu z cząsteczki, a następnie rozpad jonu molekularnego na jony fragmentacyjne. Powstałe jony są następnie przyspieszane polem elektrostatycznym, a następnie kierowane poprzez szczelinę ogniskującą do **analizatora** spektrometru mas, gdzie są rozdzielane w zależności od stosunku ich masy do ładunku m/z . Większość tworzących się jonów ma ładunek dodatni. W przypadku jonizacji strumieniem elektronów powstaje ok. 10% jonów ujemnych, które są wychwytywane przez ścianki komory jonizacyjnej.

Podobnie jak jest duża różnorodność źródeł jonów (jonizacja strumieniem elektronów, jonizacja polem elektrycznym, jonizacja chemiczna, desorpcja polem elektrycznym, bombardowanie szybkimi atomami, itd.), tak jest wiele różnych typów analizatorów, na przykład analizator magnetyczny, analizator z podwójnym ogniskowaniem, analizator czasu przelotu, analizator kwadrupolowy. Ten ostatni nazywany jest też kwadrupolowym filtrem masowym i najczęściej jest stosowany w układzie GC/MS.

m/z Jest to stosunek wartości masy (wyrażonej w u) do wartości ładunku jonu (wyrażonej w jednostkach ładunku elementarnego). Jest to więc liczba niemianowana. Jednostka masy atomowej u jest zdefiniowana jako 1/12 masy atomu izotopu węgla ^{12}C .

Analizatory kwadrukowe są zbudowane z czterech równoległych prętów, stanowiących dwie pary elektrod (rys. 3). Do elektrod przyłożone jest napięcie $\pm(U + V \cos \omega t)$, mające składową stałą U i składową zmienną $V \cos \omega t$ o amplitudzie V i częstotliwości radiowej ω .



Rys. 3. Zasada działania analizatora kwadrukowego.

Przyłożone napięcie generuje między elektrodami oscylujące pole elektryczne, pod którego wpływem jony poruszające się dotąd wzdłuż osi z , zaczynają oscylować w płaszczyźnie prostopadłej do tej osi. Częstotliwość napięcia zmiennego jest tak regulowana, aby przez analizator przepuszczane były selektywnie jony tylko o jednym stosunku m/z , a jony różniące się stosunkiem m/z od zadanego ulegały zubożeniu na ściankach i prętach analizatora. Jony o określonym stosunku m/z poruszają się więc po stabilnym torze o kształcie sinusoidy i po opuszczeniu filtru masowego trafiają do detektora.

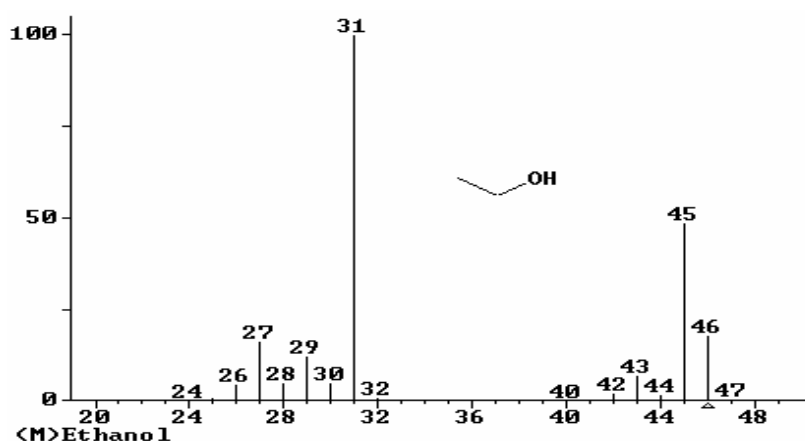
Analizatory kwadrukowe mogą być stosowane tylko do badania substancji, których masy cząsteczkowe nie przekraczają 1000. Ponadto analizatory tego typu odznaczają się małą zdolnością rozdzielczą, tj. rozdzielczością jednostkową. To oznacza, że np. jonowi o stosunku $m/z = 28$ przypisana jest masa 28, ale nie można jednoznacznie określić składu elementarnego tego jonu, może to być CO_2 , N_2 czy C_2H_4 . Stąd uzyskiwane widma masowe nazywane są niskorozdzielczymi.

W **detektorze** mierzy się natężenie prądu jonowego odpowiadające poszczególnym jonom. Detektorami w spektrometrach mas są powielacze jonów. Odpowiedni układ elektrod wtórnych pozwala uzyskać wzmocnienie sygnału rzędu 10^6 . Sygnał z detektora jest kierowany na przetworniki analogowo-cyfrowe, gdzie sygnał analogowy jest przetwarzany na sygnał cyfrowy, który jest wprowadzany do komputera. **Komputer** opracowuje dostarczone

dane, przetwarza i drukuje informacje w postaci znormalizowanych widm masowych. Można także przedstawić dane w funkcji czasu, na przykład całkowitego prądu jonowego (TIC-total ion current) . Komputer zawiera zbiór wzorcowych widm masowych, najczęściej dla 70-100 tys. związków. Identyfikacja nieznanego związku polega na porównaniu jego widma masowego z widmem zamieszczonym w bazie, dla którego uzyskuje się najlepszą zgodność z widmem eksperymentalnym. Większość izomerów ma prawie identyczne widma masowe. Może się również zdarzyć, że substancje o różnej budowie mogą mieć bardzo podobne widma. Dlatego błędy podczas identyfikacji występują stosunkowo często. Należy więc kierować się przynajmniej jednym dodatkowym kryterium, na przykład czasem retencji.

Spektrometr masowy jest urządzeniem pracującym pod wysoką próżnią, gdyż jony muszą przebyć w nim drogę 1-2 m bez zderzeń z innymi cząsteczkami. Warunek ten jest spełniony przy próżni nie gorszej niż 10^{-5} Tr. Próżnię taką uzyskuje się za pomocą dwustopniowego układu złożonego ze wstępnej pompy rotacyjnej (0,01 Tr) i pompy dyfuzyjnej zapewniającej wymaganą wysoką próżnię końcową.

Widmo masowe zawiera szereg linii obrazujących zależność natężenia prądu jonowego od stosunku masy jonu do jego ładunku. Najczęściej widmo przedstawia się w formie znormalizowanej graficznie, jak pokazano na Rys. 4 na przykładzie etanolu. Pik o największej intensywności na widmie masowym nazywany jest **pikiem głównym**, któremu przypisuje się intensywność równą 100%. Intensywność pozostałych pików wyraża się w procentach intensywności pików głównego. A zatem odkładając na osi odciętych wartość m/z jonów, a na osi rzędnych intensywność linii, otrzymamy widmo masowe analizowanego związku. Widmo masowe można również przedstawić w postaci wydruku (Rys. 5).



Rys. 4. Widmo masowe etanolu przedstawione w formie graficznej

Ethanol

Formula: C₂H₆O

MW: 46 CAS#: 64-17-5 NIST#: 61254 ID#: 835 DB: mainlib

Other DBs: TSCA, RTECS, EPA, USP, HODOC, NIH, EINECS, IRDB

Contributor: D.HENNEBERG, MAX-PLANCK INSTITUTE, MULHEIM, WEST GERMANY

Masses and Abundances

24	1	27	165	30	49	33	1	42	21	45	488	48	Tr
25	9	28	52	31	999	40	Tr	43	70	46	179		
26	46	29	122	32	10	41	3	44	17	47	5		

Synonyms:

- | | | |
|--------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1. Ethyl alcohol | 19. Molasses alcohol | 39. Denatured alcohol SD-30 |
| 2. Alcohol | 20. Potato alcohol | 40. Denatured alcohol SD-39b |
| 3. Alcohol anhydrous | 21. Aethanol | 41. Denatured alcohol SD-39c |
| 4. Algrain | 22. Aethylalkohol | 42. Denatured alcohol SD-40m |
| 5. Anhydrol | 23. Alcohol, dehydrated | 43. Etanolo |
| 6. Denatured ethanol | 24. Alcohol, diluted | 44. Ethanol 200 proof |
| 7. Ethyl hydrate | 25. Alcohols | 45. Ethyl alc |
| 8. Ethyl hydroxide | 26. Alcool ethylique | 46. Etylowy alkohol |
| 9. Jaysol | 27. Alcool etilico | 47. EtOH |
| 10. Jaysol S | 28. Alkohol | 48. NCI-C03134 |
| 11. Methylcarbinol | 29. Cologne spirits | 49. Spirits of wine |
| 12. SD Alcohol 23-hydrogen | 30. Denatured alcohol CD-10 | 50. Spirt |
| 13. Tecsol | 31. Denatured alcohol CD-5 | 51. Thanol |
| 14. C ₂ H ₅ OH | 32. Denatured alcohol CD-5a | 52. Alkohol etylowego |
| 15. Absolute ethanol | 33. Denatured alcohol SD-1 | 53. Ethanol, solution |
| 16. Cologne spirit | 34. Denatured alcohol SD-13a | 54. Ethyl alcohol anhydrous |
| 17. Fermentation alcohol | 35. Denatured alcohol SD-17 | |
| 18. Grain alcohol | 36. Denatured alcohol SD-23a | |
| | 37. Denatured alcohol SD-28 | |
| | 38. Denatured alcohol SD-3a | |

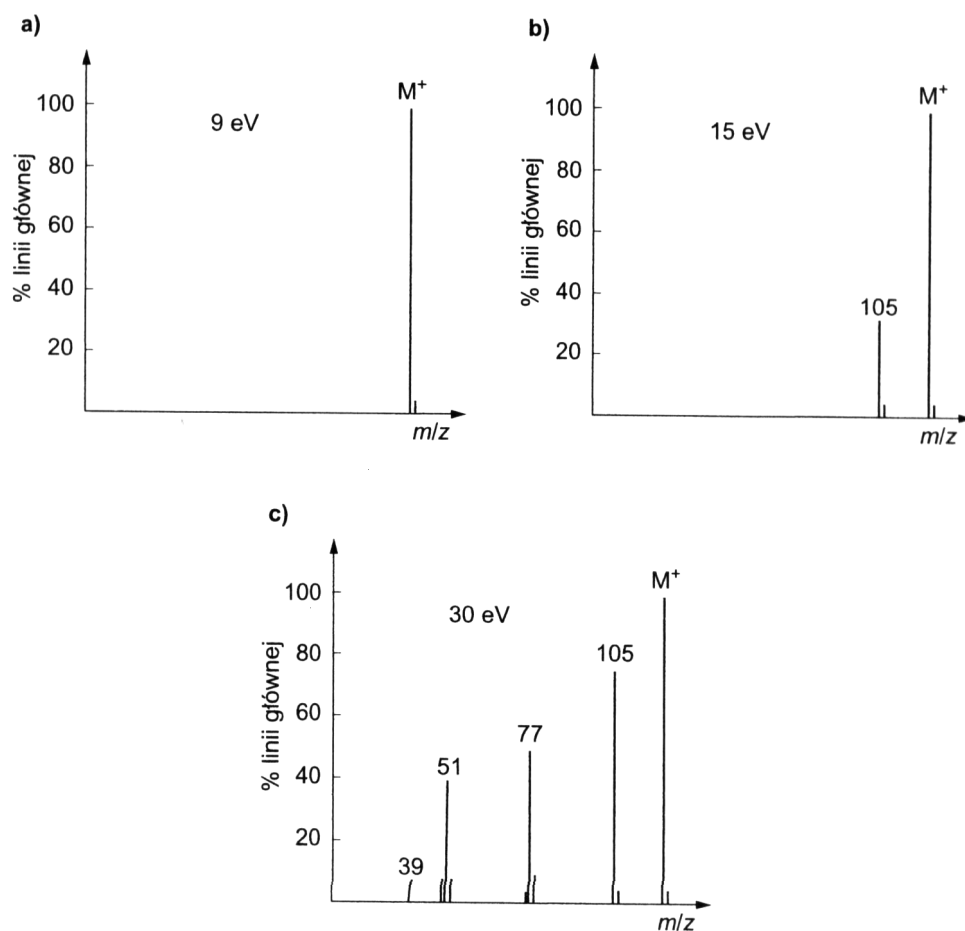
Rys. 5. Widmo masowe etanolu przedstawione w formie wydruku cyfrowego

Widmo masowe zawiera w sobie informację o tym, na jakie fragmenty rozpadł się badany związek oraz z jaką względną wydajnością powstały poszczególne fragmenty. Należy zauważyć, że w przypadku jonizacji strumieniem elektronów, obraz widma masowego zależy od energii elektronów bombardujących cząsteczkę analizowanego związku. Mając na uwadze, że energie jonizacyjne typowych związków organicznych wynoszą od kilku do kilkunastu eV, energia elektronów w źródle jonów nie powinna być mniejsza od tej wartości. Napięcie przyspieszające elektrony można zmieniać w sposób ciągły od 5 do 100 V. W układzie GC/MS stosuje się napięcie 70 V, co oznacza że elektrony mają energię 70 eV. Widma masowe otrzymywane przy tym napięciu przyjęto jako standardowe.

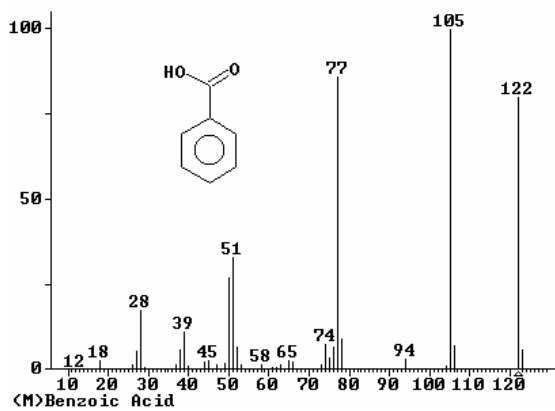
Znaczny nadmiar energii w stosunku do energii wymaganej do jonizacji cząsteczek wywołuje proces rozpadu jonów molekularnych czyli fragmentację, co jest istotą spektrometrii mas. Przy bombardowaniu elektronami o małej energii fragmentacja cząsteczek organicznych zachodzi w niewielkim stopniu i w widmie masowym występuje intensywny pik jonu molekularnego, natomiast w przypadku bombardowania elektronami o dużej energii następuje intensywna fragmentacja. Na Rys. 6 przedstawiono widmo masowe kwasu benzoowego C_6H_5COOH uzyskane przy jonizacji techniką EI i bombardowaniu elektronami o energii 9 eV, 15 eV i 30 eV (rys. 5) i 70 eV (Rys. 7).

Niskorozdzielcze widmo masowe jest obrazem struktury chemicznej badanego związku. W widmie czystej substancji jon molekularny (M^+), o ile jest obecny, będzie ostatni. Wartość masy tego piku w widmie masowym ustala masę cząsteczkową badanego związku, co pozwala w pewnych granicach zasugerować skład elementarny. Duża jego intensywność względna świadczy o aromatycznym charakterze badanego związku aromatycznego, a mała intensywność względna, połączona z występowaniem sekwencji co 14 jednostek masy atomowej (CH_2) sugeruje obecność w cząsteczce łańcucha alifatycznego. Za jonem molekularnym występują piki **jonów izotopowych** ($M+1$, $M+2...$) o znacznie mniejszej intensywności, co pozwala wnioskować o składzie izotopowym analizowanej substancji.

Izotopy są to odmiany tego samego pierwiastka chemicznego różniące się między sobą masą atomową przy tej samej liczbie atomowej, tzn. przy tej samej liczbie protonów, a różnej neutronów w jądrze atomowym pierwiastka.



Rys. 6. Widmo masowe C₆H₅COOH uzyskane techniką EI o energii elektronów: a, 9 eV; b, 15 eV; c, 30 eV



Rys. 7. Widmo masowe C₆H₅COOH uzyskane techniką EI o energii elektronów 70 eV.

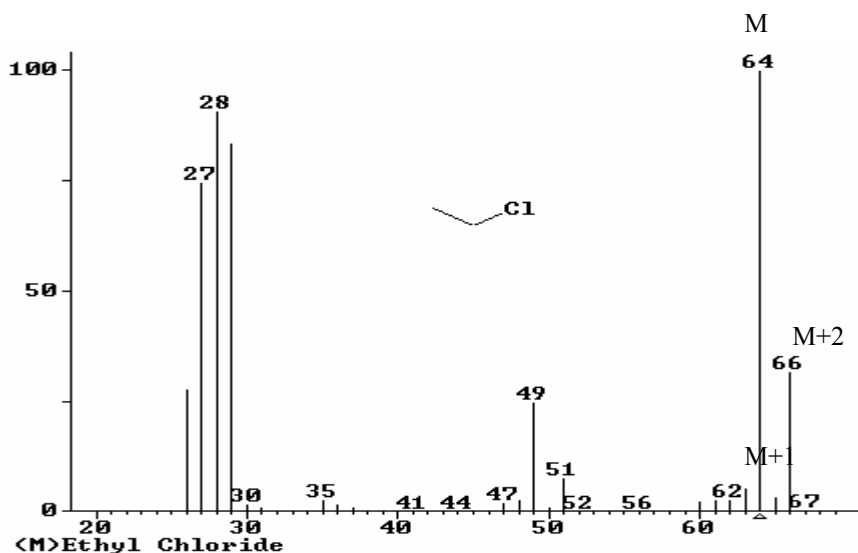
W Tabeli 2 przedstawiono składy izotopowe niektórych pierwiastków częściej spotykanych w związkach organicznych.

Tabela 2

Składy izotopowe niektórych pierwiastków występujących w związkach organicznych

Liczba atomowa	Pierwiastek	Skład izotopowy w %		
1	Wodór	^1H (99,9852%)	^2H (0,01492%)	-
6	Węgiel	^{12}C (98,892%)	^{13}C (1,108%)	-
7	Azot	^{14}N (99,635%)	^{15}N (0,365%)	-
8	Tlen	^{16}O (99,759%)	^{17}O (0,037%)	^{16}O (99,759%)
9	Fluor	^{18}F (100%)	-	-
14	Krzem	^{28}Si (92,17%)	^{29}Si (4,71%)	^{28}Si (92,17%)
15	Fosfor	^{31}P (100%)	-	-
16	Siarka	^{32}S (95,0%)	^{33}S (0,760%)	^{34}S (4,22%)
17	Chlor	^{35}Cl (75,53%)	^{37}Cl (24,47%)	-
35	Brom	^{79}Br (50,52%)	^{81}Br (49,48%)	-
53	Jod	^{127}I (100%)	-	-

W spektrometrii masowej znaczący udział izotopów obserwuje się wtedy, gdy zawartość danego izotopu przekracza 1%. W przypadku atomów węgla występują dwa naturalne izotopy: ^{12}C (98,892%) i ^{13}C (1,108%). To oznacza, że cząsteczka zawierająca na przykład 10 atomów węgla daje pik o masie M+1 o intensywności stanowiącej 11% intensywności piku o masie M. Dla atomów wodoru izotop ^1H jest jedynym znaczącym izotopem. Również azot i tlen traktować możemy z punktu widzenia spektrometrii masowej związków organicznych jako monoizotopowe. Głównym izotopem siarki jest ^{32}S (95,0%), ale znaczącym jest też izotop ^{34}S (4,22%). W przypadku chloru i bromu, występują dwa izotopy o dużym udziale ^{35}Cl i ^{37}Cl (3:1) oraz ^{79}Br i ^{81}Br (1:1). Tak duży udział drugiego izotopu w bardzo charakterystyczny sposób wpływa na obraz widm masowych. Obecność jonów izotopowych M+2, M+4 itd. wskazuje na występowanie chloru lub bromu w cząsteczce. Pokazano to na przykładzie chlorku etylowego (Rys. 8).



Rys. 8. Widmo masowe chlorku etylowego

Analizator GC/MS może pracować w trybie *Scan* lub *SIM* (selective ion monitoring). Pracując w trybie *scan* spektrometr skanuje cały zakres mas, a w trybie *SIM* rejestruje natężenie prądu jedynie dla wybranych jonów o masie charakterystycznej dla danego związku. Metoda *SIM* jest szczególnie przydatna, gdy dany składnik w złożonej mieszaninie występuje w bardzo małych ilościach. Teoretycznie umożliwia analizę ilościową z bardzo dużą dokładnością, nawet rzędu ppb. Jednakże na poziom detekcji ma duży wpływ matryca obniżając poziom wykrywalności do nanogramów.

Interpretacja widm masowych

Jak powyżej wspomniano, fragmentacja jonów zależy od energii elektronów powodujących jonizację cząsteczki i jest procesem charakterystycznym dla danego związku. Badania różnych związków organicznych pozwoliły na sformułowanie pewnych uogólnień dotyczących rozpadu cząsteczek na fragmenty, a oto niektóre z nich [1]:

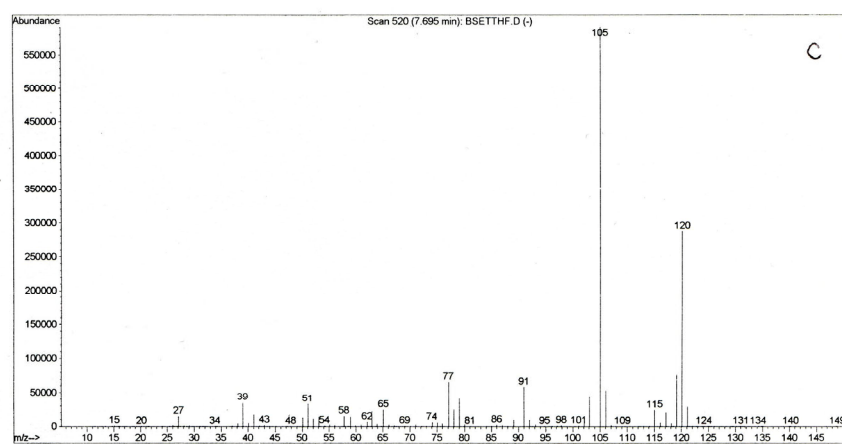
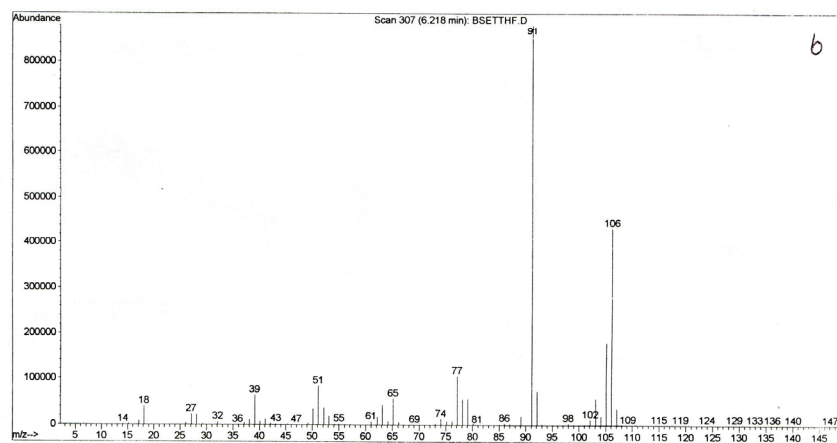
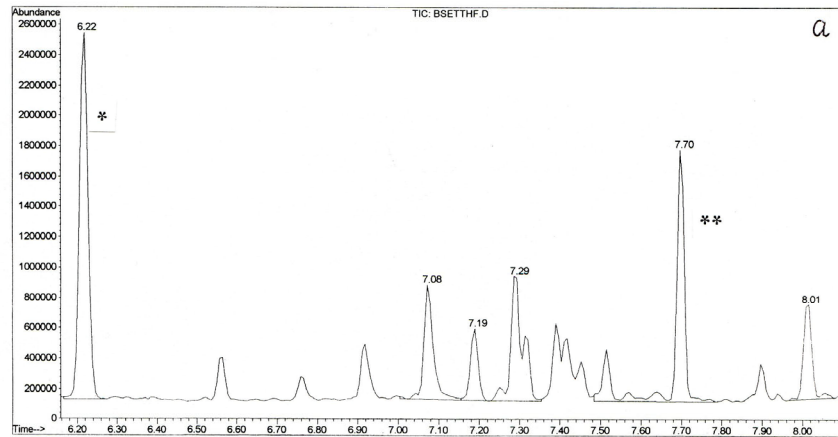
- Względna wysokość linii macierzystej jest największa dla związków o prostym łańcuchu i zmniejsza się w miarę wzrostu stopnia rozgałęzienia łańcucha.
- Względna wysokość linii macierzystej w związkach szeregu homologicznego zmniejsza się ze wzrostem masy cząsteczkowej.
- Rozpad związku jest uprzywilejowany przy atomach węgla znajdujących się w rozgałęzieniach.
- Wiązania podwójne, układy cykliczne i pierścienie aromatyczne stabilizują jon macierzysty.
- W związkach aromatycznych zawierających podstawniki alkilowe najbardziej prawdopodobny jest rozpad β względem pierścienia.

- Fragmentacja łączy się z eliminacją małych, trwałych, obojętnych cząsteczek, np. alkenów, alkoholi, CO, HCN, H₂O, NH₃, H₂S lub rodników OH[•], H[•], SH[•], CN[•], rodników alkilowych R[•], alkoksylowych R-O[•] itp.

W wielu przypadkach wskazówki te nie wyznaczają dróg fragmentacyjnych dla niektórych związków. Interpretacja widm masowych nieznanego związku o złożonej budowie nie jest prosta i wymaga dużego doświadczenia. Dlatego przed przystąpieniem do analizy należy zebrać wszystkie możliwe informacje o badanej substancji, które mogą ułatwić jej identyfikację. Należy podkreślić, że z samego widma masowego często niemożliwe jest odgadnięcie struktury badanego związku. W takich przypadkach przydatne są inne metody analizy instrumentalnej, jak spektroskopia w podczerwieni (IR) lub magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).

Na poniższym przedstawiono przykład chromatografu TIC (całkowity prąd jonowy) frakcji węglowodorowej wydzielonej z węgla oraz widma masowe wybranych składników tej frakcji.

Rys.3. Chromatogram frakcji wydzielonej z ekstraktu węglowego (a), widmo masowe * ksylenu (b) i ** trimetylobenzenu (c)



III. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest oznaczanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w próbkach gruntu, polegające na ich ekstrakcji rozpuszczalnikiem organicznym, a następnie jakościowej i ilościowej analizie chromatograficznej ekstraktu metodą chromatografii gazowej z detektorem mas (GC-MS).

IV. Sposób wykonania ćwiczenia

1. Materiały i odczynniki:

- analizowana próbka gruntu,
- heptan, cz.d.a.,
- wzorzec wewnętrzny: roztwór *p*-cymenu w heptanie o stężeniu 200 mg/dm³,
- mieszanina standardowa zawierająca sześć wyselekcjonowanych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych o stężeniu 100 mg/dm³ każdy i 40 mg/dm³ *p*-cymenu.

2. Przygotowanie próbki do analizy chromatograficznej - ekstrakcja aromatów.

Odważyć około 0,5 g próbki gleby i umieścić w fiolce, dodać 2 ml heptanu i prowadzić proces ekstrakcji w łaźni ultradźwiękowej w czasie 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie fiolkę wyjąć z łaźni, osuszyć, dodać 0,5 ml wzorca wewnętrznego, wstrząsnąć i pozostawić fiolkę na kilkanaście minut, aż osad ulegnie sedymentacji – ewentualnie użyć wirówki. Próbka jest gotowa do analizy. Pobierając określoną ilość ekstraktu do strzykawki chromatograficznej, należy uważać aby do igły strzykawki nie przedostawały się części stałe badanej próbki.

3. Parametry pracy chromatografu gazowego (HP6890)

- temperatura dozownika **250°C**
- kolumna HP-1701 lub inna o zbliżonej polarności o długości 30 m i średnicy 0,25 mm
- prędkość przepływu gazu nośnego (hel) 0,7 ml/min
- program temperaturowy **50°C/ 1 min, narost 10°C/min do 260°C**
- split **1:20**
- objętość dozowanej próbki **1,0 µl**

Uwaga: aparaturą analityczną GCMS należy się posługiwać wyłącznie zgodnie ze wskazaniami i w obecności nauczyciela prowadzącego ćwiczenia.

4. Analiza ekstraktu badanej próbki i mieszaniny standardowej w opcji SCAN-MS

W opcji SCAN detektor mas identyfikuje wszystkie jony fragmentacyjne w zaprogramowanym, zwykle szerokim zakresie mas cząsteczkowych. Tę opcję stosuje się głównie do identyfikacji jakościowej związków. Po wykonaniu analiz, dla mieszaniny standardowej i ekstraktu o nieznanym składzie należy:

- zidentyfikować analizowane indywidua,
- określić czasy retencji wykrytych związków,
- określić jony główne w widmie masowym analizowanych związków i jony molekularne (jeżeli są obecne).

Wykonanie tych zadań kończy pierwszą część ćwiczenia.

5. Analiza ekstraktu badanej próbki i mieszaniny standardowej w opcji SIM-MS

W opcji SIM (*selective ion monitoring*) identyfikowane są tylko jony fragmentacyjne o zadanej wartości m/z . Dzięki temu otrzymuje się chromatogramy analizowanych próbek z niskim poziomem tła pochodzącego od substancji przeszkadzających, intensywność sygnałów jest bardziej proporcjonalna do masy dozowanej próbki niż w opcji SCAN. Metoda ta jest zalecana do analizy ilościowej. Aby odpowiednio ustawić parametry aparatury analitycznej, musimy skorzystać z danych uzyskanych w pierwszej części ćwiczenia – p.4. Po przygotowaniu układu GC-MS do analizy w trybie SIM, podobnie jak poprzednio wykonujemy analizę chromatograficzną mieszaniny standardowej i ekstraktu.

6. Przygotowanie sprawozdania

- krótki opis wykonanego ćwiczenia,
- opracowanie wyników analizy metodą GC-MS próbki skażonej WWA, w tym identyfikacja związków należących do tej grupy na podstawie otrzymanych chromatogramów i widm masowych poszczególnych składników,
- obliczenie zawartości (w % mas.) zidentyfikowanych WWA w analizowanej próbce.

W opracowaniu korzystano z następującej bibliografii:

1. J.Namieśnik, Z.Jamrógiewicz, *Fizykochemiczne metody kontroli zanieczyszczeń środowiska*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1998
2. J. R. Dojlido, *Chemia wód powierzchniowych*, Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko,

Białystok, 1995

3. M.Świdorska-Bróż, *Mikrozanieczyszczenia w środowisku wodnym*, PWr, Wrocław, 1993
4. R.M.Silverstein, G.C.Bassler., *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych*, Warszawa, PWN, 1970
5. W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, Warszawa 2002.
6. A.S. Płaziak, *Spektrometria masowa związków organicznych*, Wyd. Naukowe UM, Poznań 1997.