



Εργαστήριο Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης

ΑΣΚΗΣΗ 4

ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Η χρωματογραφία είναι μια μέθοδος διαχωρισμού μειγμάτων, που στηρίζεται στις διαφορετικές κατανομές των συστατικών ενός μείγματος μεταξύ δύο φάσεων. Η μία φάση παραμένει σταθερή στο σύστημα και λέγεται **στατική φάση (stationary phase)**, ενώ η άλλη λέγεται **κινητή φάση (mobile phase)** και διέρχεται μέσα ή επάνω από την επιφάνεια της σταθερής φάσης. Η κινητή φάση προκαλεί μετατόπιση των συστατικών ενός μείγματος σε διαφορετικές θέσεις μέσα στη χρωματογραφική στήλη, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους.

Η αέρια χρωματογραφία αναπτύχθηκε ως αναλυτική τεχνική τα τελευταία εβδομήντα χρόνια. Η τεχνική αυτή είναι σχετικά απλή και χρησιμοποιείται για την ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα, προϊόντα πετρελαίου κ.λπ. Στην αέρια χρωματογραφία η ακίνητη φάση είναι το υλικό της στήλης και η κινητή φάση το φέρον αέριο.

Η αρχή της μεθόδου της αέριας χρωματογραφίας στηρίζεται στο ότι μικρή ποσότητα δείγματος παραλαμβάνεται από την αέρια κινητή φάση (το φέρον αέριο, το οποίο είναι ένα αδρανές αέριο, όπως υδρογόνο, άζωτο, ήλιο ή αργό), μεταφέρεται σε μια λεπτή τριχοειδή στήλη η οποία περιέχει κατάλληλο προσροφητικό υλικό (στατική φάση) για να επιβραδύνει την ροή με διαφορετικό ποσοστό για κάθε συστατικό του δείγματος, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό αυτών.

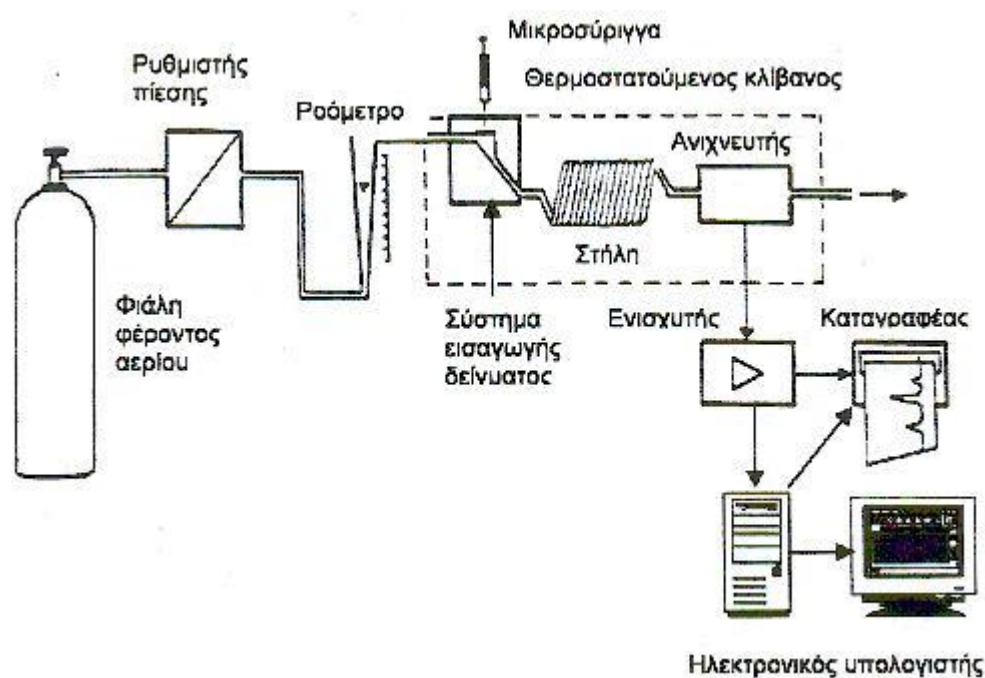
Τα διαχωριζόμενα συστατικά εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης (χαρακτηριστικοί για κάθε συστατικό), διέρχονται από τον ανιχνευτή ο οποίος συνδέεται με καταγραφικό, όπου το σήμα του ανιχνευτή μετατρέπεται σε καμπύλη. Η θέση της καμπύλης καθορίζεται από το είδος του συστατικού, το δε εμβαδό της καμπύλης είναι ανάλογο της ποσότητας (συγκέντρωση) του συστατικού αυτού στο δείγμα.

Για μια επιτυχή ανάλυση, τα προς ανάλυση συστατικά πρέπει να είναι πτητικά, με μοριακό βάρος <1250 u και θερμικά σταθερά, ώστε να μην καταστρέφονται μέσα στη συσκευή.

Το αποτέλεσμα ονομάζεται **αεριοχρωματογράφημα**. Η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών του μίγματος γίνεται μετά από σύγκριση με πρότυπες ουσίες.

Η **οργανολογία** του αέριου χρωματογράφου είναι:

1. Πηγή φέροντος αερίου (που αποτελείται από την φιάλη του φέροντος αερίου, ένα ρυθμιστή πίεσης και το ροόμετρο).
2. Θερμοστατούμενος κλίβανος (που αποτελείται από τον εισαγωγέα του δείγματος, τον θάλαμο εξαέρωσης και την στήλη)
3. Ανιχνευτής
4. Καταγραφικό



Για καλό διαχωρισμό πρέπει :

1. Η εισαγωγή του δείγματος να είναι ακαριαία για να αποφευχθεί η διασπορά της ζώνης του δείγματος.
2. Ο όγκος του δείγματος να είναι όσο το δυνατό μικρότερος.

3. Ο χώρος εξαέρωσης του δείγματος να θερμαίνεται υψηλότερα από την θερμοκρασία της στήλης για άμεση εξαέρωση του δείγματος.

Μεγάλο μέρος όλης της αεριοχρωματογραφίας εκτελείται με **προγραμματισμό θερμοκρασίας**, στον οποίο η θερμοκρασία της στήλης αυξάνεται κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού ώστε να αυξηθεί η τάση ατμών των διαχωριζόμενων ουσιών και να μειωθεί ο χρόνος κατακράτησης των συστατικών που εκκλύονται αργά.

Για τον ποιοτικό έλεγχο και την ταυτοποίηση των συστατικών μετράται ο **χρόνος κατακράτησης (Rt)** ή ο **δείκτης Kovat's** και γίνεται σύγκριση με τους αντίστοιχους χρόνους ή δείκτες προτύπων ουσιών ή με τις τιμές της βιβλιογραφίας.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό μετράται το εμβαδό του τριγώνου που σχηματίζεται από την κορυφή και τη γραμμή βάσης και συγκρίνεται με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς με το αντίστοιχο εμβαδό διαφόρων αραιώσεων της ταυτοποιηθείσας πρότυπης ουσίας.

Οι δυνατότητες της αέριας χρωματογραφίας αυξάνουν σημαντικά εάν χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής των συστατικών που εξέρχονται από τη στήλη, ένα **φασματόμετρο μάζας** (mass spectrometer), οπότε μιλάμε για **αέρια χρωματογραφία/φασματομετρία μάζας (GC/MS)**.

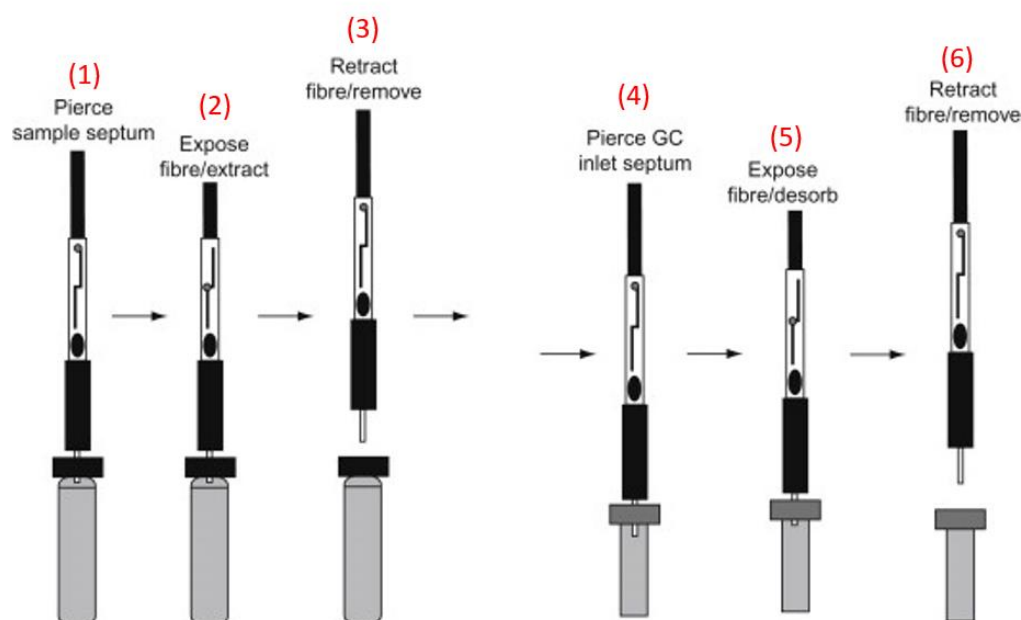
Το φασματόμετρο μάζας προκαλεί την διάσπαση κάθε συστατικού που εξέρχεται από τη στήλη σε ιόντα, και στη συνέχεια το διαχωρισμό των ιόντων σύμφωνα με τη μάζα και το φορτίο τους.

Η καταγραφή των θραυσμάτων του κάθε συστατικού που εξέρχεται από τη στήλη αποτελεί το λεγόμενο **φάσμα μάζας** του συστατικού και αποτελεί κατά κάποιο τρόπο το δακτυλικό του αποτύπωμα. Η σύγκριση του φάσματος μάζας κάθε συστατικού με φάσματα μάζας γνωστών ουσιών επιτρέπει την ταυτοποίηση του συστατικού, εργασία η οποία σήμερα γίνεται ταχύτατα με ηλεκτρονικούς υπολογιστές που περιέχουν βιβλιοθήκες φασμάτων μάζας σε ηλεκτρονική μορφή.

Η **προετοιμασία του δείγματος** είναι πολύ σημαντική για να γίνει σωστά η αναλυτική διαδικασία. Ένα βασικό βήμα κατά την προετοιμασία είναι το βήμα εκχύλισης, για την απομόνωση των ενώσεων στόχων (targets analytes) σε μια φάση πιο συμβατή με το σύστημα της ενόργανης ανάλυσης. Οι **τεχνικές μικροεκχύλισης** είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές για αναλύτες με πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης, ενώ ταυτόχρονα ελαχιστοποιούν την χρήση οργανικών διαλυτών καθώς και τον όγκο του δείγματος που απαιτείται ακολουθώντας τις αρχές της Πράσινης Αναλυτικής Χημείας (GAC).

Η **τεχνική της μικροεκχύλισης στερεής φάσης (SPME)** δεν απαιτεί τη χρήση οργανικών διαλυτών και επιπλέον ενσωματώνει τη διαδικασία της δειγματοληψίας, εκχύλισης, συμπύκνωσης και εισαγωγής του δείγματος σε ένα μόνο σύστημα. Η μεθοδολογία αυτή εφαρμόζεται για την απομόνωση ενώσεων υψηλής και μέτριας πτητικότητας και είναι επί της ουσίας μία μέθοδος προσυγκέντρωσης (preconcentration) των αναλυτών. Οι αναλύτες κατανέμονται, βάσει της σταθεράς κατανομής τους, μεταξύ της μήτρας και της πολυμερικής στατικής φάσης με την οποία είναι επικαλυμμένη μια λεπτή τριχοειδής ίνα από τηγμένο διοξείδιο του πυριτίου (fused silica gel). Όταν το σύστημα φτάσει σε ισορροπία, η ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται παραμένει σταθερή, μέσα στα όρια του πειραματικού σφάλματος, και ανεξάρτητα του επιπλέον χρόνου εκχύλισης.

Τα βήματα της τεχνικής SPME φαίνονται στο παρακάτω σχήμα:



1. Διάτρηση του ελαστικού διαφράγματος (septum) που υπάρχει στο πώμα του φιαλιδίου από το έμβολο.
2. Το έμβολο πιέζεται προς τα κάτω, η ίνα εξάγεται και είτε βυθίζεται στο διάλυμα (εκχύλιση μη πτητικών ουσιών) είτε εκτίθεται στον υπερκείμενο χώρο (εκχύλιση πτητικών ουσιών) για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.
3. Η ίνα επανεισάγεται στη συσκευή SPME holder με την κίνηση του εμβόλου προς τα πάνω και το έμβολο αποσύρεται από το φιαλίδιο.

4. Η συσκευή SPME holder εισάγεται στο σύστημα έγχυσης της υγρής ή αέριας χρωματογραφίας.
5. Η ίνα εκτίθεται ξανά για ορισμένο χρονικό διάστημα μέσα στο σύστημα έγχυσης.
6. Η ίνα επανεισάγεται στη συσκευή SPME holder και η συσκευή απομακρύνεται από το σύστημα εισαγωγής/έγχυσης.

Στην εργαστηριακή άσκηση θα πραγματοποιήσετε την τεχνική της μικροεκχύλισης και θα σας παρουσιαστούν αναλυτικά τα τμήματα ενός αέριου χρωματογράφου/φασματογράφου μάζας (GC/MS).

Στα παρακάτω παραδείγματα παρουσιάζονται χρωματογραφήματα πολυαρωματικών υδρογονανθράκων (**PAHs**), με τις παραμέτρους και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα με τα οποία πραγματοποιήθηκαν.

Απαντήστε στις ερωτήσεις που ακολουθούν κάθε παράδειγμα.

1^ο παράδειγμα

Όγκος έγχυσης (Injection volume): 1μL

Αρχική συγκέντρωση μίγματος 4 PAHs (Stock Solution PAH mix): 100 mg/L σε ακετονιτρίλιο

Σύσταση μίγματος: Ναφθαλίνιο (Nap), Ακεναφθένιο (Ace), Φαιναθρένιο (Phe), Φλουρανθένιο (Flu)

Παράμετροι για την μέθοδο του GC		
Θερμοκρασία εισαγωγή	250 °C	
Ροή στήλης	1 mL/min	
Τύπος Έγχυσης	Split	
Αναλογία split	1:20	
Θερμοκρασιακό πρόγραμμα φούρνου GC		
Ρυθμός αύξησης (°C / min)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος παραμονής (min)
-	75	2
25	150	2
10	240	15

Συνολικός χρόνος ανάλυσης: 31 min



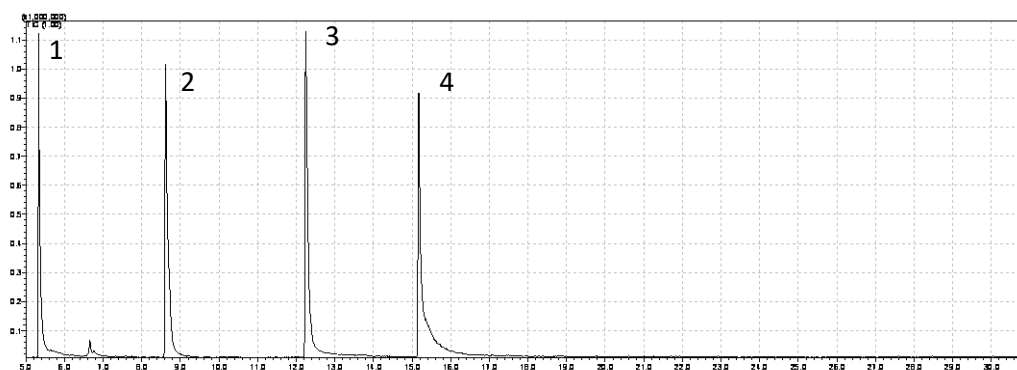
Παράμετροι για την μέθοδο του MS

Θερμοκρασία Πηγής Ιοντισμού (°C)	220
Interface θερμοκρασία (°C)	270
Εύρος m/z	50-350

Πληροφορίες Στήλης

Τριχοειδής Στήλη	DB-5-MS
Πολικότητα	Μερικώς άπολη
Διαστάσεις	30m x 0.25 mm ID x 0.25 μm

Το χρωματογράφημα της παραπάνω ανάλυσης είναι:



Τα αποτελέσματα της ανάλυσης είναι:

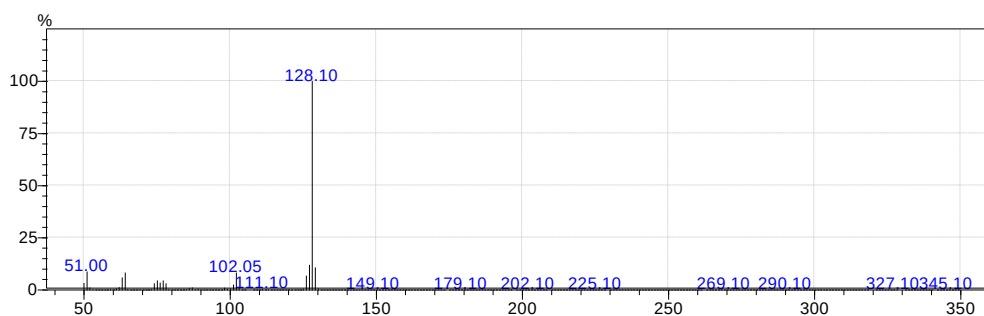
#	Rt	AREA
1	5.328	1995854
2	8.614	2020553
3	12.242	2846732
4	15.168	2964056

-Να δώσετε σε πίνακα τις παρακάτω ιδιότητες των 4 ενώσεων που αναλύθηκαν: Μοριακός τύπος, Μοριακό Βάρος, Σημείο Ζέσεως, Σημείο Τήξεως, Τάση Ατμών, Διαλυτότητα στο νερό, $\log K_{OW}$, και Σταθερά Henry.

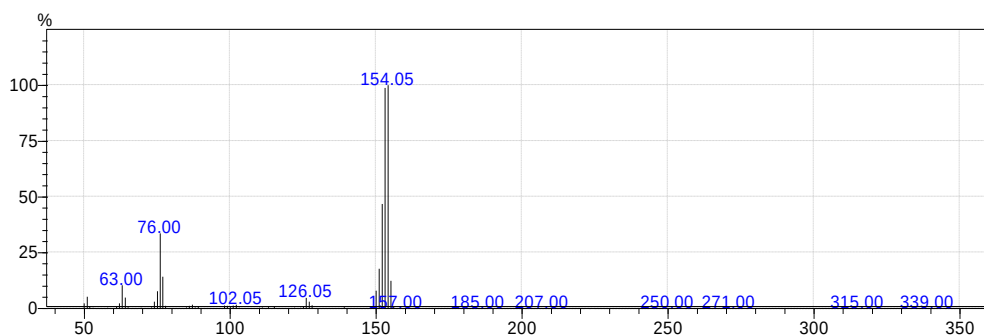
-Να βρείτε τη σειρά έκλουσης των 4 ενώσεων, να αντιστοιχήσετε φάσματα και να συζητήσετε το λόγο αυτής της σειράς που εκλούνται, σύμφωνα με τις αρχές διαχωρισμού χρωματογραφίας και των ιδιοτήτων των υπό μελέτη ενώσεων.

Δίνονται τα φάσματα μάζας των ενώσεων Ναφθαλίνιο (Nap), Ακεναφθένιο (Ace), Φαινανθρένιο (Phe), Φλουρανθένιο (Flu):

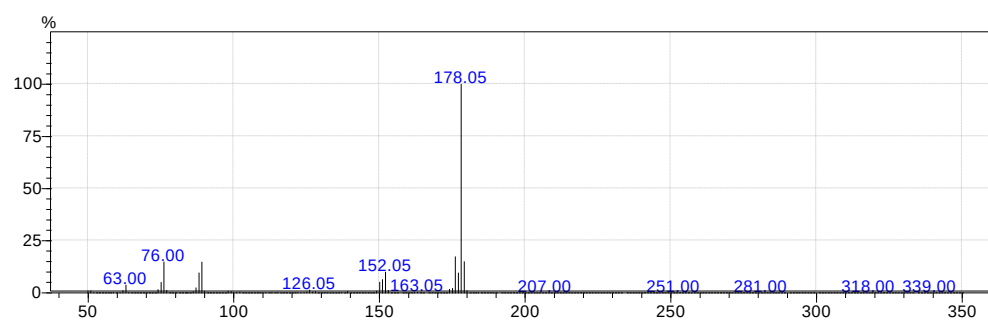
Nap



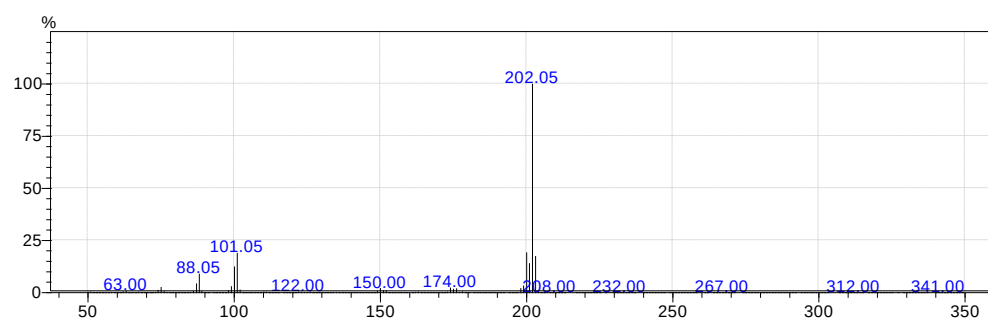
Ace



Phe



Flu



2^ο παράδειγμα

Όγκος έγχυσης (Injection volume): 1 μ L

Αρχική συγκέντρωση μίγματος 4 PAHs (Stock Solution PAH mix): 100 mg/L σε ακετονιτρίλιο

Σύσταση μίγματος: Ναφθαλίνιο (Nar), Ακεναφθένιο (Ace), Φαιναθρένιο (Phe), Φλουρανθένιο(Flu)

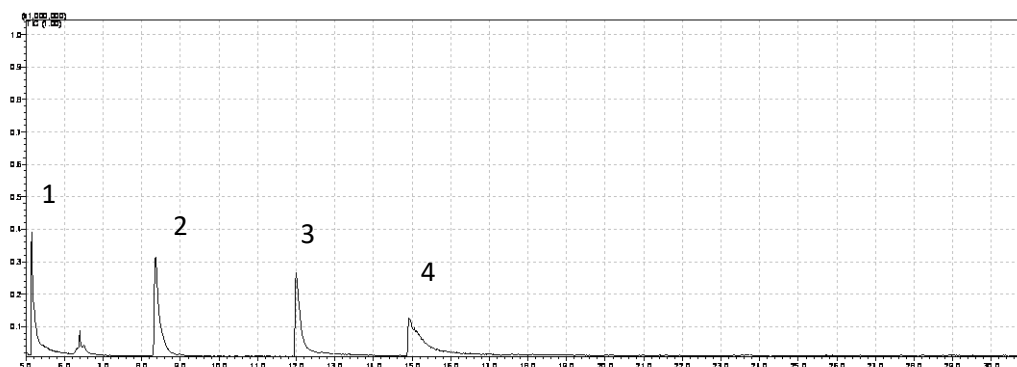
Παράμετροι για την μέθοδο του GC		
Θερμοκρασία εισαγωγέα	250 °C	
Ροή στήλης	1.2 mL/min	
Τύπος Έγχυσης	Split	
Αναλογία split	1:20	
Θερμοκρασιακό πρόγραμμα φούρνου GC		
Ρυθμός αύξησης (°C / min)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος παραμονής (min)
-	75	2
25	150	2
10	240	15
Συνολικός χρόνος ανάλυσης: 31 min		



Παράμετροι για την μέθοδο του MS	
Θερμοκρασία Πηγής Ιοντισμού (°C)	220
Interface θερμοκρασία (°C)	270
Εύρος m/z	50-350

Πληροφορίες Στήλης	
Τριχοειδής Στήλη	DB-5-MS
Πολικότητα	Μερικώς άπολη
Διαστάσεις	30m x 0.25 mm ID x 0.25 μ m

Το χρωματογράφημα της παραπάνω ανάλυσης είναι:



Και τα αποτελέσματα της ανάλυσης είναι:

#	Rt	AREA
1	5.145	1274946
2	8.357	1062226
3	12	1316949
4	14.91	1214030

Εάν η σειρά έκλουσης παραμένει η ίδια, να εξηγήσετε σε τι διαφέρει και γιατί το χρωματογράφημα του 2^{ου} παραδείγματος από το χρωματογράφημα του 1^{ου} παραδείγματος.

3^ο παράδειγμα

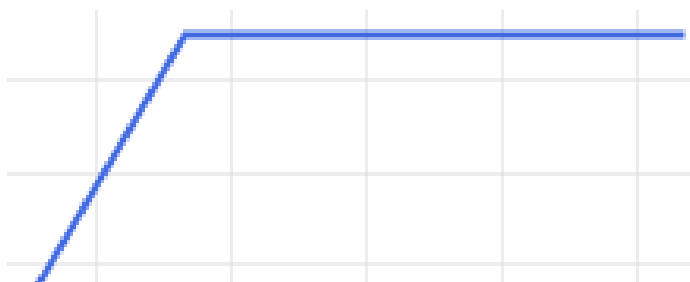
Όγκος έγχυσης (Injection volume): 1 μ L

Αρχική συγκέντρωση μίγματος 4 PAHs (Stock Solution PAH mix): 100 mg/L σε ακετονιτρίλιο

Σύσταση μίγματος: Ναφθαλένιο (Nap), Ακεναφθένιο (Ace), Φαιναθρένιο (Phe), Φλουρανθένιο(Flu)

Παράμετροι για την μέθοδο του GC	
Θερμοκρασία εισαγωγή	250 °C
Ροή στήλης	1 mL/min
Τύπος Έγχυσης	Split
Αναλογία split	1:20

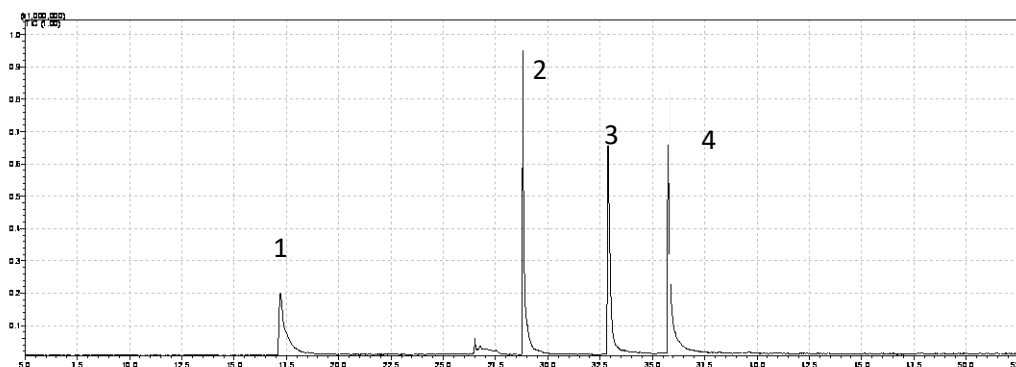
Θερμοκρασιακό πρόγραμμα φούρνου GC		
Ρυθμός αύξησης (°C / min)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος παραμονής (min)
-	75	20
10	240	37
Συνολικός χρόνος ανάλυσης: 73.5 min		



Παράμετροι για την μέθοδο του MS	
Θερμοκρασία Πηγής Ιοντισμού (°C)	220
Interface θερμοκρασία (°C)	270
Εύρος m/z	50-350

Πληροφορίες Στήλης	
Τριχοειδής Στήλη	DB-5-MS
Πολικότητα	Μερικώς άπολη
Διαστάσεις	30m x 0.25 mm ID x 0.25 μm

Το χρωματογράφημα της παραπάνω ανάλυσης είναι:



Τα αποτελέσματα της ανάλυσης είναι:

#	Rt	AREA
1	17.221	2277982
2	28.806	2120158
3	32.873	2724924
4	35.741	2747401

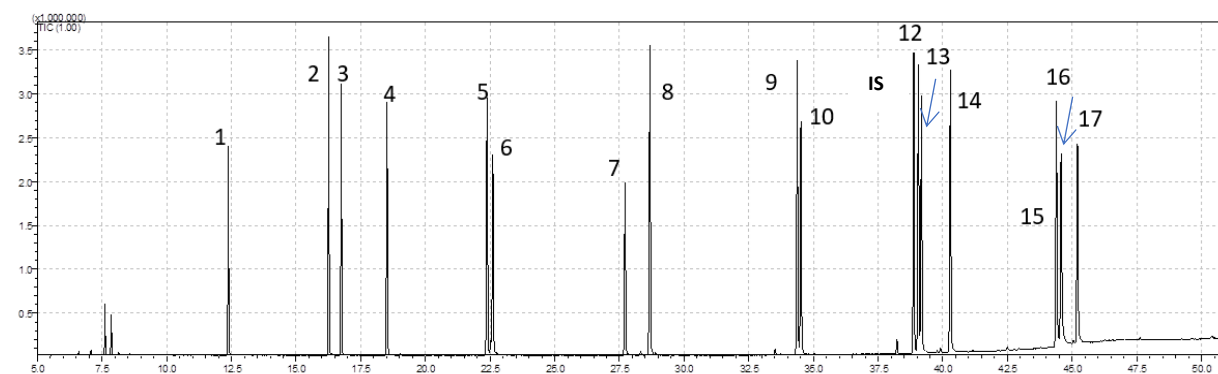
Εάν η σειρά έκλουσης παραμένει η ίδια, να εξηγήστε σε τι διαφέρει και γιατί το χρωματογράφημα του 3^{ου} παραδείγματος από το χρωματογράφημα του 1^{ου} παραδείγματος;

4ο Παράδειγμα

Ανάλυση διαλύματος 16 ενώσεων PAHs, συγκέντρωσης 100 mg/L για καθεμία σε διαλύτη ακετονιτρίλιο, με απευθείας έγχυση 1μL στον εισαγωγέα του GC.

Οι 16 ενώσεις είναι : Ναφθαλίνιο, Ακεναφθένιο, Ακεναφθυλένιο, Φλουορένιο, Φαινανθρένιο, Ανθρακένιο, Φλουορανθένιο, Πυρένιο, Βενζο[α]ανθρακένιο, Χρυσένιο, Βενζο[β]φλουορανθένιο, Βενζο[κ]φλουορανθένιο, Βενζο[α]πυρένιο, Διβενζο[α,η]ανθρακένιο, Βενζο[ghi]περυλένιο, Ινδενο[1,2,3-cd]πυρένιο, Βενζο[ε]πυρένιο.

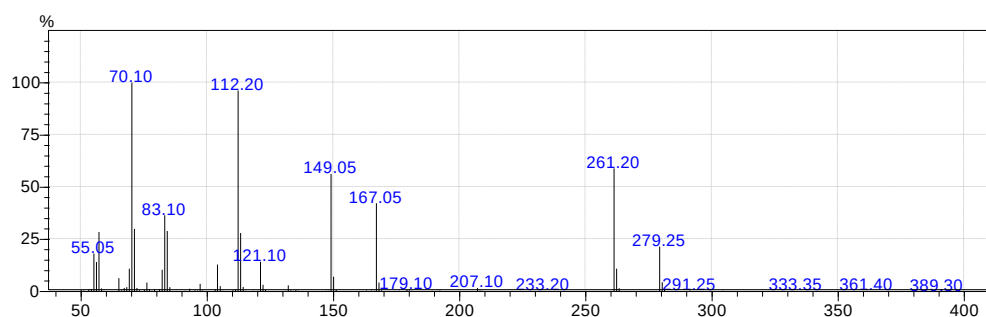
Το χρωματογραφήμά τους είναι:



Τα αποτελέσματα της ανάλυσης είναι:

#	Rt	AREA
1	12.377	2330664
2	16.259	3700028
3	16.744	1791127
4	18.511	2770827
5	22.384	4018344
6	22.603	3322687
7	27.714	2970100
8	28.676	5399587
9	34.374	4676242
10	34.516	3679554
IS	38.878	1495931
12	39.061	4995433
13	39.176	4217994
14	40.294	4797460
15	44.395	4219271
16	44.575	3578765
17	45.206	3599453

Η κορυφή IS αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο, το οποίο είναι η ένωση 1,4-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylexyl)ester (1,4-Βενζοδικαρβοξυλικό οξύ, δις(2-αιθυλεξυλ)εστέρας) και το φάσμα μάζας της είναι:



1. Να δώσετε σε πίνακα τις παρακάτω ιδιότητες των 16 ενώσεων που αναλύθηκαν: Μοριακός τύπος, Μοριακό Βάρος, Σημείο Ζέσεως, Σημείο Τήξεως, Τάση Ατμών, Διαλυτότητα στο νερό, $\log K_{ow}$, και Σταθερά Henry.

2. Συζητήστε τις ιδιότητες των ενώσεων που θα επηρεάσουν τη σειρά έκλουσης των 16 PAHs και τη γενική αναμενόμενη σειρά τους.
3. Εξηγήστε τι είναι το IS, δώστε τη δομή του και αντιστοιχήστε όσα πιο πολλά φράγματα ιόντος μπορείτε στο φάσμα μάζας;
4. Σας δίνεται το φάσμα μάζας μιας από τις ενώσεις που αναλύθηκαν. Προσδιορίστε με βάση τα στοιχεία που έχετε σε ποια κορυφή του χρωματογραφήματος αντιστοιχεί.

5ο Παράδειγμα

Εάν επιλέξετε να προσθέσετε ένα βήμα προετοιμασίας δείγματος και με χρήση SPME κάνετε αναλύσεις δειγμάτων νερού, τότε συζητήστε γενικά τι θα καταφέρετε όσον αφορά την απόδοση της νέας μεθόδου.