

Alacsony oldószer- és mintaigényű minta-előkészítési módszer többgyűrűs aromás szénhidrogének gázkromatográfiás meghatározásához

LEZSÁK Gábor,^a RIKKER Tamás,^b TORKOS Kornél^a és EKE Zsuzsanna^{a,b,*}

^aEötvös Loránd Tudományegyetem, Kémiai Intézet, Elválasztástechnikai Kutató és Oktató Laboratórium, Pázmány Péter sétány 1/A, 1117 Budapest, Magyarország

^bWESSLING Nemzetközi Kutató és Oktató Központ Közhasznú Nonprofit Kft., Fóti út 56, 1047 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

Az ELTE Kémiai Intézetében működő Elválasztástechnikai Kutató és Oktató Laboratórium (EKOL) 2003 októberében jött létre. Alapítói és egyben jelenlegi fenntartói a WESSLING Nemzetközi Kutató és Oktató Központ Nonprofit Kft. és az ELTE Kémiai Intézete. A laboratórium közel egy évtizedes működése kitűnő példája annak, hogy miként vonható be a magántőke az egyetemi oktatásba és kutatásba. Az EKOL egyik fenntartójaként a WESSLING jelentős mértékben támogatja az elválasztástechnika elméleti és gyakorlati oktatását a Kémiai Intézetben az órarendi oktatás révén éppúgy, mint szakdolgozók és doktoranduszok kutató munkájának lehetővé tételével. Mindeközben a kutatási eredmények hasznosítása mellett a WESSLING-nek lehetősége nyílik kölcsönösen megismerkedni az elválasztástechnika iránt érdeklődő végzősökkal.

Az EKOL kutatási tevékenységét két fő csoportra oszthatjuk. Egyfelől eszközparkunk és szaktudásunk együttműködések keretében hozzáférhető más kutatócsoportok munkájának analitikai támogatásához. Másfelől érdeklődésünk elsődleges fókuszja a gáz- és a folyadékkromatográfiás módszerek fejlesztése beleértve természetesen a hozzájuk tartozó minta-előkészítési lépéseket is. Az új módszerek kidolgozása során az analitikai teljesítményjellemzők (kimutatási határ, mérési tartomány, torzítatlanság, ismételhetség...) mellett mindig igyekszünk tekintettel lenni a környezetvédelmi és gazdaságossági szempontokra is.

Jelen közleményben egy, az utóbbi szempontoknak is kiválóan megfelelő gázkromatográfiás (GC) módszert mutatunk be, mivel úgy véljük, hogy tevékenységünk bemutatására alkalmasabb egy adott fejlesztésünk részletes ismertetése, mint az elmúlt évek szerteágazó fejlesztéseinek felületes felsorolása.

2. A többgyűrűs aromás szénhidrogének

A többgyűrűs aromás szénhidrogének (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAH) a szerves szennyezők közé tartoznak. Kondenzált gyűrűkből állnak, és nem tartalmaznak heteroatomot, vagy oldalláncot. Magas hőmérsékleten ($T > 700^\circ\text{C}$), természetes vagy antropogén folyamatok hatására (égetés, elgázosítás, hőbomlás, stb.) keletkeznek széntartalmú vegyületekből. A környezetben elsősorban a talajban és üledékben fordulnak elő. Dúsulnak továbbá olajban, szénkénben és kátrányos lerakódásokban valamint

fontos komponensei a levegőben szuszpendált apró szemcseméretű anyagoknak is. A levegőben terjedő PAH-ok (viszonylag csekély vízoldhatóságuk ellenére) a felszíni vizekben - felületaktív anyagok közreműködésével - oldatba kerülnek, más részük a növények levelére kondenzálódik. A felszíni vizekből bejuthatnak az ivóvízbe és az élelmiszerekbe is.

Számos tanulmány bizonyítja, hogy létezik korreláció a PAH expozíció és rákos megbetegedések kialakulása között.^{1,2} A többgyűrűs aromás szénhidrogének közül több is bizonyítottan karcinogén, mutagén és teratogén hatással rendelkezik.^{3,4}

3. A többgyűrűs aromás szénhidrogének meghatározása ivóvíz-mintákban

A fentiek alapján nem meglepő, hogy a PAH-ok mennyiségének monitorozása környezeti mintákban fontos, folyamatos és nagy mintaszámot eredményező feladat. A feladat megoldására természetesen már sokféle válasz született, melyek között éppúgy találunk gáz-, mint folyadékkromatográfiás elválasztást alkalmazókat. Ezek közül bármelyiket is válasszuk a minta-előkészítés meghatározó lépése az analitikai módszerünknek.

Az MSZ 1484-6:2003 szabvány szerint a minta-előkészítés folyadék-folyadék extrakcióval (LLE) végezhető el. Felszíni vizek PAH tartalmának meghatározásához 250 – 2000 ml térfogatú mintát kell több részletben, összesen 30-90 ml apoláris oldószerrel, pl. n-hexánnal extrahálni, majd ezt kb. 1 ml térfogatra koncentrálni. E lépés megvalósítható rotációs vákuumbepárlóval, vagy Kuderna – Danish féle, esetleg nitrogénáramban végzett bepárlással. A tömegspektrometriás detektorral (MSD) felszerelt gázkromatográfba 1 μl koncentrátumot áramlás leosztás mentes (splitless) üzemmódban injektálva várhatóan 1-5 ng/l-es alsó meghatározási határ (LOQ) érhető el. Ez a technika tehát megfelelően alacsony kimutatási határt biztosít, egyszerű és kellően robusztus, korszerűsége viszont megkérdőjelezhető. A módszer hátránya, hogy nem lehet automatizálni, nagy az idő- és mintaigénye, továbbá nagy mennyiségű veszélyes hulladékot termel.

A szilárd fázisú extrakció (SPE) szintén széles körben elterjedt. Alkalmazható PAH-ok szelektív dúsítására akár

* Tel.: +36-1-372-2500/1623; fax: +36-1-372-2592; e-mail: eke.zsuzsanna@wirc.eu

vízmintákból, akár más, bonyolultabb mátrixokból is. Sokféle SPE patron létezik, ezek közül PAH-ok vízből történő meghatározásához a legjellemzőbb a szilika alapú oktadecil (C18) töltet alkalmazása. A töltetet metanollal kondicionálják, majd metanol vagy *i*-propanol 10%-os vizes oldatával ekvilibrálnak. A felhasznált mennyiségek eltérnek, de mindkét lépésnél minimum a töltet térfogatának kétszerese és 10 ml közötti értéket javasolnak a szerzők. A megfelelő kimutatási határ eléréséhez 500-1000 ml mintát kell a töltetre felvinni. Az elúcióhoz többségében diklórmetán vagy diklórmetán : *n*-hexán, esetleg diklórmetán : metanol 1:1 arányú elegyét alkalmazzák. Az eluálószer térfogata 2 és 15 ml közötti. Szükség szerint további töményítési lépésként nitrogénáram alatt történő bepárlást lehet alkalmazni.^{5,6,7} A módszer meglehetősen idő- és munkaerő-igényes, de automatizálására már létezik megoldás.

A szilárd fázisú mikro-extrakció (SPME) kevésbé elterjedt a PAH-ok minta-előkészítési lehetőségei között annak ellenére, hogy praktikus, manuálisan és automatizálva is alkalmazható, oldószermentes, kis mintaigényű technika. Az extrakciót követő deszorpciós lépés a gázkromatográf injektorában kivitelezhető, így módon a minta-előkészítés a mintabemérését követően akár emberi beavatkozás nélkül megvalósítható. PAH-ok SPME-s meghatározásához a polidimetilsziloxán (PDMS) a legszélesebb körben elterjedt abszorbens. Ez a fázis lehetővé teszi az Amerikai Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatalának (US EPA) előírásai szerint vizsgálandó 17 PAH egyidejű, jó kimutatási határokkal történő meghatározását.⁸ A technika hátránya az abszorpciós fázist hordozó szálacska sérülékenysége és a technikát jellemző viszonylag gyengébb ismételtetés. Az SPME technika egyensúlyi folyamatokon alapuló diffúzió-kontrollált eljárás, ennek megfelelően a lehető legkisebb kimutatási határ és a viszonylag jó robusztusság elérésének érdekében, az egyensúly beállása a folyadék és a polimer fázis között elengedhetetlen. Az egyensúly kialakulásához szükséges idő (45-90 perc) függ a hőmérséklettől, a kevertetéstől és a mérendő komponens anyagi minőségétől.^{9,10,11}

A keverőbaba extrakció (SBSE) elve hasonlít a SPME-éhez: egy keverőbaba üvegtestének felületére kémiaiilag rögzített polimer réteg szelektíven abszorbeálja a célvegyületeket. Az extrakciós lépés és a szárítás után a komponensek egy speciális eszközzel deszorbeálhatóak közvetlenül a gázkromatográf injektorába. A PAH mérésre kidolgozott módszerek PDMS fázist alkalmaznak. E technikával is megfelelően alacsony kimutatási határokat lehet elérni. Ugyanakkor a nagyobb mintakapacitást biztosító, vastagabb PDMS fázis mérete miatt az egyensúly beállításához elegendő extrakciós idő általában több óra.^{12,13,14}

Napjainkban megjelent egy új minta-előkészítési technika, a MEPS (Microextraction by Packed Sorbent), amely az előzőekben említett módszerek hibáinak kiküszöbölésével kitűnő alternatívát jelenthet. A technika elve megegyezik a SPE-ével. Tulajdonképpen az SPE miniatürizált változata. A MEPS tú 2 – 3 mg szilárdfázisú töltetet tartalmaz, amely lehet C2, C8, C18, ioncserélő, vagy módosítatlan szilikagél. Ezt a hegyet lehet csatlakoztatni 10 – 250 µl-es, esetleg nagyobb térfogatú fecskendőhöz. A minta oldatok átpumpálásakor a célvegyületek abszorbeálódnak az állófázison. A

megfelelő oldószeres mosással a zavaró anyagok egy részét eltávolíthatjuk, ezután közvetlenül eluálhatunk folyadékkromatográf injektorába vagy nagytérfogatú injektálásra alkalmas GC injektorba.¹⁵ A módszer előnye, hogy csatlakoztatható automata mintaadagolókhöz, ezáltal költséghatékonyan lehet automatizálni. További előnye, hogy kevesebb időt, mintát és oldószert igényel, mint a korábbi módszerek. Korlátozottan illékony szerves vegyületek meghatározásához sikeresen alkalmazták már ezt a minta-előkészítési módot. Példaként említhetjük a heroin függők vérplazmájából opiátok kimutatását,¹⁶ atorvasztatin és metabolitjainak analizisét biológiai mintákból¹⁷ és gyógyszermaradványok kimutatását környezeti vizekből.¹⁸

4. Kísérleti rész

4.1. Anyagok, eszközök

A 17 célkomponenst tartalmazó ciklohexános referencia oldatot, amelynek a koncentrációja minden komponensre 10 µg/ml, a Dr Ehrenstorfer GmbH-től (Augsburg, Németország) vásároltuk. Belső standardként az Absolute Standards Inc (Hamden, CT, USA) által forgalmazott „Semivols Internal Standards mix”-et használtuk. A szerves nyomanalitikai tisztaságú *n*-hexánt és SupraSolv minőségű metanolt és *izo*-propanolt a Merck Hungary-tól (Budapest, Magyarország) kaptuk. Az adalékolt minták elkészítéséhez desztillált vizet használtunk.

A módszerfejlesztéshez kezdetben lángionizációs detektorral felszerelt (FID) Agilent 7890 GC-t (Agilent, Palo Alto, USA), később Agilent 5975 tömegszelektív detektorral (MSD) ellátott ugyancsak Agilent 7890-es GC-t és Gerstel MPS 2 XL (Gerstel, Müllheim a.d.R, Németország) automata mintaadagolót használtunk. A nagytérfogatú injektáláshoz Peltier hűtéssel ellátott Gerstel CIS 4 injektort alkalmaztunk mindkét készülék esetén. Állófázisnak a HP-5 MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) oszlopot (Agilent, Palo Alto, USA) választottuk. A minta-előkészítéshez az SGE (Ringwood, Australia) által forgalmazott C8 módosított szilikagél alapú MEPS fázist használtuk 100 µl-es gáztömör fecskendőhöz csatlakoztatva.

4.2. Kromatográfiai körülmények

Bár a kidolgozott módszer a megfelelő szelektivitás elérése érdekében tömegszelektív detektorra épül a referencia oldatokkal végzett módszerfejlesztési lépések jelentős részét FID-del felszerelt készülékkel végeztük. A két készülék a detektorukat leszámítva mindenben egyezik, ezért a GC-FID készüléken beállított injektálási paraméterek és optimált minta-előkészítési lépések módosítás nélkül átvihetők a tömegspektrométerrel szerelt készülékre. A módszer kidolgozás egyes lépései (pl ionforrás paraméterek beállítása), a validálás és a minták mérései a GC-MS készülékkel történtek.

A nagytérfogatú injektálási módszer fejlesztéséhez referenciaként használt méréseknél ún. hideg splitless üzemmódban injektáltunk 1 µl oldatot. Az injektort 10°C-ról 720°C/perc sebességgel fűtöttük fel 310°C-ig. Ezt a hőmérsékletet az injektor 5 percig tartotta. Az oszloptér hőmérséklete a hőmérséklet program első 2 percében 40°C

volt. Ezt 20°C/perc sebességgel 320°C-ig emeltük és 10 percig tartottuk. A FID-et 325°C-on 20 Hz mintavételi frekvenciával üzemeltettük.

1. Táblázat.

| Név | Célion (T) | Minősítő ion (Q) | Arány (T/Q) |
|----------------------|------------|------------------|-------------|
| | [amu] | [amu] | [%] |
| naftalin-d8 | 136 | - | - |
| naftalin | 128 | 127 | 13 |
| | | 102 | 8 |
| 2-metil-naftalin | 142 | 141 | 83 |
| | | 115 | 27 |
| 1-metil-naftalin | 142 | 141 | 88 |
| | | 115 | 28 |
| acenaftilén | 152 | 153 | 18 |
| | | 76 | 10 |
| acenaftén-d10 | 164 | - | - |
| | | 152 | 54 |
| acenaftén | 153 | 76 | 18 |
| | | 165 | 90 |
| fluorén | 166 | 139 | 8 |
| | | - | - |
| fenantrén-d10 | 188 | 176 | 19 |
| | | 152 | 9 |
| fenantrén | 178 | 176 | 19 |
| | | 152 | 8 |
| antracén | 178 | 200 | 19 |
| | | 101 | 11 |
| fluorantén | 202 | 200 | 19 |
| | | 101 | 13 |
| pirén | 202 | 226 | 29 |
| | | 114 | 15 |
| benzo(a)antracén | 228 | - | - |
| | | 226 | 30 |
| krizén-d12 | 240 | - | - |
| | | 114 | 12 |
| krizén | 228 | 250 | 28 |
| | | 126 | 18 |
| benzo(b)fluorantén | 252 | 250 | 28 |
| | | 126 | 18 |
| benzo(k)fluorantén | 252 | 250 | 28 |
| | | 126 | 18 |
| benzo(a)pirén | 252 | 250 | 34 |
| | | 126 | 21 |
| perilén-d12 | 264 | - | - |
| | | 276 | 108 |
| dibenzo(a,h)antracén | 278 | 138 | 53 |
| | | 274 | 17 |
| benzo(g,h,i)perilén | 276 | 138 | 24 |

Az egy lépcsős lefűtatást alkalmazó nagyterfogatú injektálás során 100 µl oldatot injektáltunk 1,5 µl/másodperc sebességgel ún. „solvent vent” üzemmódban. Az injektort 1,10 percig tartottuk 10°C-on, majd 720°C/perc sebességgel fűtöttük 310°C-ig, amit 5 percig tartottunk. A split ágat 1,1 percig tartottuk nyitva 150 ml/perces áramlási sebesség mellett, majd az injektálás befejeztével 3,5 percenél nyitottuk ki újra. Az oszloptér hőmérséklete a hőmérséklet program első 3,5 percében 40°C volt. Ezt 20°C/perc sebességgel 320°C-ig emeltük és 10 percig tartottuk. A FID-et 325°C-on 20 Hz mintavételi frekvenciával üzemeltettük.

A két lépcsős lefűtatást alkalmazó nagyterfogatú injektálás során 100 µl oldatot injektáltunk 1,6 µl/másodperc sebességgel ún. „solvent vent” üzemmódban. Az injektort 1,04 percig tartottuk 10°C-on, majd 720°C/perc sebességgel fűtöttük 70°C-ig, amit 3 percig tartottunk, aztán újra 720°C/perc sebességgel tovább fűtöttünk 310°C-ig, amit 5 percig tartottunk. A split ágat 1,04 percig tartottuk nyitva 160 ml/perces áramlási sebesség mellett, majd az injektálás befejeztével 6,96 percenél nyitottuk ki újra. Az oszloptér hőmérséklete a hőmérséklet program első 6,96 percében 40°C volt. Ezt 20°C/perc sebességgel 320°C-ig emeltük és 10 percig tartottuk. A FID-et 325°C-on 20 Hz mintavételi frekvenciával üzemeltettük.

A kidolgozott módszer: 1,5 ml mintához 0,6 V/V% izopropanolt adunk és lezárt fiolában az automata tálcájára helyezzük. A mintából 60-szor 100 µl-nyit pumpálunk át a C8-as MEPS tölteten 10 µl/másodperc sebességgel. A kondicionáláshoz és ekvilibráláshoz rendre 200 - 200 µl n-hexánt, izo-propanolt és vizet használunk. Az elúciót 3-szor 40 µl n-hexánnal végezzük, az injektálás előtt legalább 10 percet várunk. A felső fázisból 100 µl-nyit injektálunk a két lépcsős lefűtatást alkalmazó nagyterfogatú injektálás paramétereinek megfelelően. Az oszloptér hőmérsékletét 6,96 percig tartjuk 40°C-on, majd 20°C/perc sebességgel emeljük 320°C-ig, amit 10 percig tartunk. A GC-t az MSD-vel összekötő szakaszt 320°C-on tartjuk és 70 eV-os ionizációs energia mellett szelektív ionkövetéses (SIM) üzemmódban mérünk.

A belső standardok és a mérendő komponensek cél- és minősítő ionjainak tömege és azok intenzitás arányai az 1. táblázatban szerepelnek.

4.3. Nagyterfogatú injektálás

Mivel a MEPS állófázison abszorbeált anyagok teljes eluálásához nagyobb mennyiségű oldószere van szükség, mint amennyit a hagyományos split/splitless technikával injektálni lehet nagyterfogatú injektálás mellett döntöttünk. Az ideális injektálási beállítások keresése során minden komponensre nézve 0,1 µg/ml koncentrációjú PAH csúcsterületeket egy referencia kromatogram n hexános csúcsterületeihez viszonyítottuk, belső standardos korrekció nélkül. A referencia kromatogramot 1 µl 10 µg/ml koncentrációjú oldatot ún. hideg splitless módú injektálásával vettük fel, így biztosítva, hogy a referencia és a vizsgált körülmények között azonos legyen az injektorba jutott mérendő komponens anyagmennyisége.

Programozhatóan fűthető injektort alkalmazva a nagyterfogatú injektálás klasszikus módszerének tekinthető,

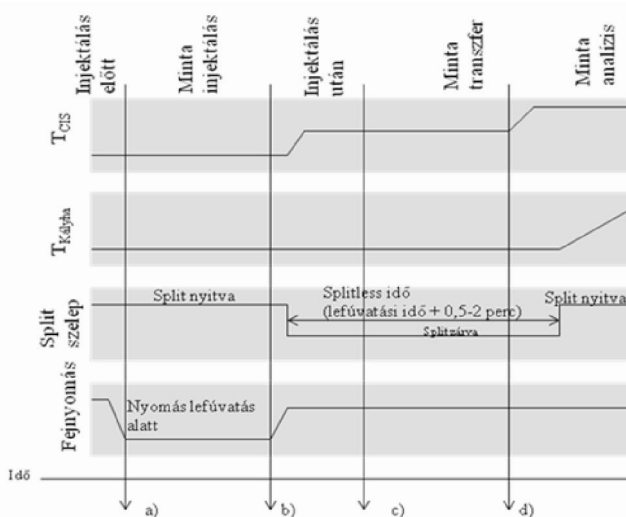
az ún. „solvent vent” injektálás. Ilyenkor a mintát alacsony hőmérsékleten juttatjuk az injektorba, miközben a split ág nyitva van. Megfelelő gázáramlást biztosítva a minta oldószere a split ágon keresztül eltávolítható, majd a split ág zárását követően a kevésbé illékony mérendő komponensek az injektor felfűtésével juttathatók az oszlopra. A módszer alkalmazásának elengedhetetlen feltétele, hogy számottevő különbség legyen a minta oldószereinek és a legillékonyabb mérendő komponenseknek az illékonyasága között.

A nagyterefogatú injektálás ideális beállításainak megállapításakor elsődleges szempont, hogy az oldat kiáramlása a fecskendőből elég lassú legyen ahhoz, hogy a folyadék a liner falán filmet képezzen. Ehhez nyújt segítséget az alábbi összefüggés, amely megadja az injektálás optimális sebességét adott paraméterek mellett.¹⁹

$$I = \frac{M * P_s}{\rho * R * T_a} * \frac{P_a}{P_{inlet}} * F_{split}$$

Ahol I az injektálás sebessége [ml/perc], M az oldószere moláris tömege [g/mol], P_s az oldószere gőznyomása az injektor kiindulási hőmérsékletén [bar], ρ az oldószere sűrűsége [g/ml], R az egyetemes gázállandó [ml*bar]/[mol*kg], T_a az injektor kiindulási hőmérséklete [K], P_a a légköri nyomás (általában 1,013 bar), P_{inlet} a fejtömeg és a légköri nyomás összege, F_{split} az áramlási sebesség a split ágon [ml/perc].

A következő paramétereket az elérhető legkisebb értékeken rögzítettük: az injektor kezdeti hőmérsékletét 10°C-nak, a fejtömeget 0 bar-nak választottuk. Ezután optimalizáltuk a lefűtési áramlási sebességét és az injektálási sebességét. Az előbbi hatását vizsgáltuk 80, 120 és 150 ml/perc-nél. Az injektálási sebesség hatását pedig az előbbi egyenletről kapott értéknél, valamint annak 1,2; 1,4 és 1,5-szörösénél vizsgáltuk. Sajnos a legillékonyabb komponens, a naftalin, visszanyerése legjobb esetben sem érte el az 50%-ot.



1. Ábra. A két lépcsős lefűtést alkalmazó nagyterefogatú injektálás menete: a) Injektálás ideje, az injektált mennyiségtől és a sebességétől függ; b) A maradék oldószere az oszlopon keresztül fűvatódik le; c) Az illékony komponensek az oszlop elején fókuszálódnak; d) Minta transzfer az oszlopra, GC analízis elindul

Megoldásként áttértünk a laboratóriumunkban korábban kidolgozott, két lépcsős lefűtést alkalmazó módszerre.²⁰ Az illékony komponensek nagyobb visszanyerését

érhetjük el úgy, hogy az oldószere nagy részét a split ágon fűvatójuk le, az utolsó néhány mikrolitert pedig az oszlopon keresztül, ahol az injektorból elpárologó komponensek az oldószerevel felduzzasztott fázisban fókuszálódnak. A kétlépcsős lefűtési során az oldószere teljes elpárologása előtt az injektor hőmérsékletét megemljük az oldószere forráspontja alá 10°C-kal és a split szelepet bezárjuk. A hőmérséklet emelésétől az oldószere gőznyomása megnő, mivel a split szelep zárva van, csak az oszlopon keresztül tud lefűvatódni, ahol az illékony komponensek fókuszálódnak az oldószerevel felduzzasztott állófázisban (1. ábra). E módszer alkalmazásával a 4.2 fejezetben bemutatott beállításokkal elérhető, hogy a legillékonyabb komponens, a naftalin, visszanyerése is 100% legyen és a csúcsalakok is megfelelőek legyenek.

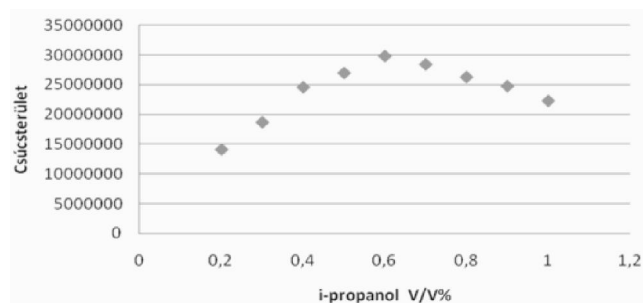
4.4. A minta-előkészítés

Amennyiben vízminták feldolgozására szilárdfázisú extrakciós minta-előkészítést alkalmazunk gáz-kromatográfiai analízis előtt, a töltet pórusaiban és a pórusok közötti térben maradt víz problémát okoz, ezért az extraktumot Na₂SO₄ szárítószerrel víztmentesítjük. Mivel a MEPS minta-előkészítési technika elve megegyezik a szilárdfázisú extrakcióval, a víztmentesítés ezúttal is szükséges. Ennek igazolásához a kidolgozott kétlépcsős lefűtést alkalmazó injektálással hexános standard oldatot injektáltunk olyan MEPS fecskendővel, melyet előzőleg vízzel mostunk. Az így kapott eredmények mentesek az extrakció hibájától, csak a tölteten maradó víztartalomtól adódó hibát tartalmaznak. E mérések során akkora vízmennyiség került az oszlopra, hogy a detektor (FID) lángját elhaladtában több alkalommal is eloltotta. Azon esetekben, amikor a detektálás nem hiúsult meg az eredmények szórása nagy volt: a kapott csúcsterületek relatív szórása komponensről függően 16 és 31% közé esett. Ez egyrészt visszavezethető arra, hogy a tölteten maradt vízmennyiség miatt nem lehetett pontosan felszívni 100 µl apoláris oldószert, azaz a felszívott mennyiség nem volt reprodukálható. Másrészt a nagyterefogatú injektálás a bepárlási lépések miatt igen érzékeny a minta oldószereinek illékonyaságára, ami a reprodukálhatatlan mennyiségben jelenlévő víz miatt számottevően és reprodukálhatatlanul változik. A tölteten maradt vízmennyiséget először többszöri levegő átpumpálásával kíséreltük meg eltávolítani, de ez nem vezetett sikerre. Ezért az extrakció után az anyagot nem közvetlenül az injektorba, hanem egy szűkítővel ellátott fiolába eluáltuk. Így kihasználható, hogy a n-hexán és a víz egymással nem elegyedő oldószerek és a PAH-ok nagyságrendekkel jobban oldódnak n-hexánban. Bizonyos idő után a fázisok szétválnak, az alsó vizes fázis gyakorlatilag nem tartalmaz célkomponenseket, a felső hexános fázis pedig víztmentes. A leoldás hatékonyságának növelése érdekében az elúciót 4 × 30 µl (összesen 120 µl) oldószerevel végeztük. Így már az első 30 µl-es elúció eltávolítja a tölteten maradt víz nagy részét. A fázisszétváláshoz tapasztalataink szerint 10 perc elegendő. Ezt követően ugyan csak 100 µl n-hexános oldatot injektálunk, a fellépő kb. 16 %-os veszteséget azonban bőven kárpótol minket a módszer reprodukálhatóságának javulása (ld. RSD% a 2. táblázatban)

A PAH-ok vízmintákból történő meghatározásának további ismert nehézsége, hogy a PAH-ok rossz vízoldhatóságuk

miatt a mintából kitapadnak a mintatartó edény falára. Az LLE alkalmazásakor megoldást jelenthet, ha a minta ismert térfogatát tartalmazó mintatartó edény falát is átmoszuk az extrahálószerrel. SPE és MEPS esetén ez azonban nem kivitelezhető. Ilyen esetben megoldást jelenthet, ha a PAH-ok oldékonyságát a mintában izopropanol hozzáadásával javíthatjuk. Ráadásul az izopropanol egyaránt elegyedik a PAH-ok törzsadatainak oldószerével, a ciklohexánnal és a vízzel. Ezért a munkaoldatokat célszerű izopropanolos hígítással készíteni. Figyelembe kell azonban venni, hogy túl sok izopropanol viszont rontja az extrakció határfokát. A mintákhoz adandó izopropanol ideális mennyiségének meghatározását 1 ng/ml PAH tartalmú vizes oldatokkal végeztük. A csúcsterületeknek az izopropanol koncentrációjának függése a fenantrén példáján a 2. ábrán látható. A görbének maximuma van 0,6 V/V% izopropanol tartalomnál. Az izopropanol kisebb mennyiségben adagolva még nem viszi teljesen oldatba a komponenseket, nagyobb mennyiségben viszont rontja az extrakció határfokát. Mérés előtt tehát a mintákhoz célszerű minden esetben ennek megfelelő mennyiségű izopropanolt adni, figyelembe véve a minta adalékoláshoz használt izopropanolos standard oldatok és az izopropanolos belső standard oldatok mennyiségét is.

A mért minták térfogata minden esetben 1,5 ml volt. Egy extrakció során az alkalmazott fecskendő méretéből adódóan 100 µl oldatot áramoltattunk át a MEPS állófázison 10 µl/sec sebességgel. Az állófázison való átpumpálás többszöri ismétlésével nő az extrakciós határfok. Az 50 - 100 tartományban vizsgálva az átpumpálások számát, azt tapasztaltuk, hogy 60 pumpálás már minden vizsgált komponens esetén elegendő a maximális visszanyerés eléréséhez.

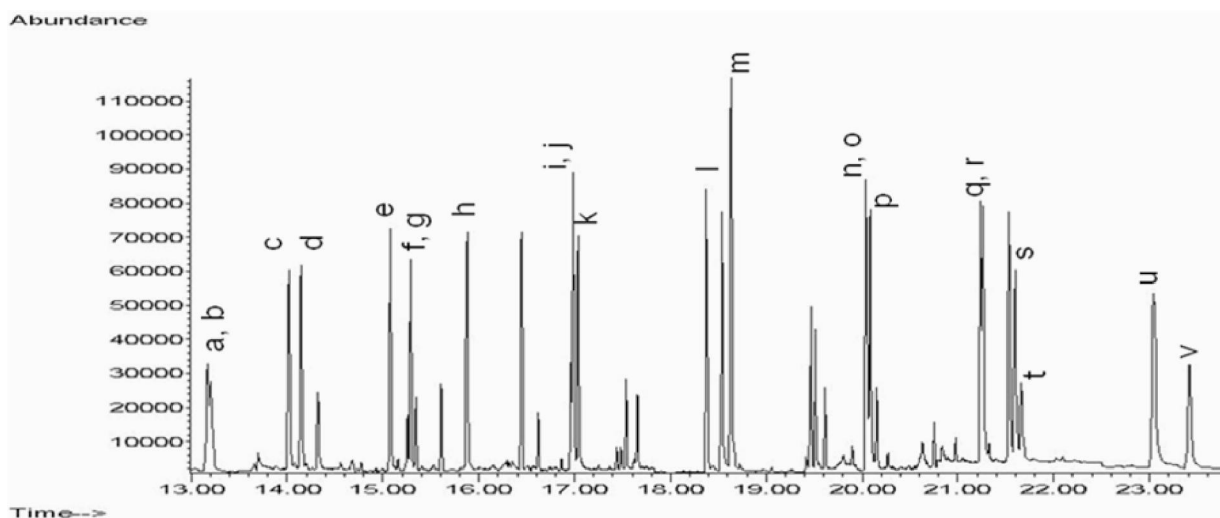


2. Ábra. A fenantrén csúcsterületének nagysága a mintához adalékolt izopropanol koncentrációjának függvényében.

Az SPE patronokkal szemben a MEPS tük nem csak egyszer használatosak. Emiatt feltétlenül fontos, hogy két minta között megfelelően kitisztítsuk a tükben lévő szorbenst. A memóriaeffektus vizsgálatához a legtöményebb kalibrációs minta (200 ng/ml) mérését követően a tük a adott mennyiségű n-hexánnal, izopropanollal és vízzel mostuk, illetve kondicionáltuk, úgy ahogy ez a mérések során a következő extrakció előtt is történik. Ezt követően azonban az extrakció elvégzése helyett rögtön az elúciós lépés következett, hogy lássuk maradt-e még mérendő komponens a tölteten az előző mintából. Tapasztalataink szerint a felsorolt oldószerek mindegyikéből 200 µl-et használva biztosítható, hogy ne maradjon a következő mérés eredményét befolyásoló mennyiségű PAH a tölteten.

4.5. A kidolgozott módszer jellemzése

A kidolgozott módszer analitikai teljesítmény jellemzőit a 2. táblázatban foglaltuk össze.



3. Ábra. Adalékolt csapvíz-minta totál ion kromatogramja (10 ng/l) a) naftalin-d8, b) naftalin, c) 2-metil-naftalin, d) 1-metil-naftalin, e) acenaftilén, f) acenaftén-d10, g) acenaftén, h) fluorén, i) fenantrén-d10, j) fenantrén, k) antracén, l) fluorantén, m) pirén, n) benzo(a)antracén, o) krizén-d12, p) krizén, q) benzo(b)fluorantén, r) benzo(k)fluorantén, s) benzo(a)pirén, t) perilén-d12, u) dibenzo(a,h)antracén, v) benzo(g,h,i)perilén

A módszer szelektivitását az MSZ 1484-6:2003 szabvány szerinti méréssel ellenőrzött PAH-okat nem tartalmazó csapvíz és felszíni vízminták, valamint ezek PAH-okkal adalékolt részleteinek vizsgálatával ellenőriztük és megfelelőnek találtuk.

A módszer linearitását az 5-200 ng/L koncentrációtartományban hét különböző szinten adalékolt 5-5

párhuzamos minta elemzésével igazoltuk. A legkisebb négyzetek módszerével meghatározott regressziós paramétereket 2. táblázat tartalmazza. E paraméterek közül az egyenes meredeksége egyúttal a módszer érzékenységét is jól jellemzi.

A 2. táblázatban feltüntetett torzítatlanság és ismételhetség meghatározást 10 ng/l koncentrációjú oldatból végeztük 5

párhuzamos mérésével. A torzítatlanság értékek minden komponensre 80 és 120% közé esnek, a relatív szórás pedig egyedül az acenaftilén esetén haladja meg a 8%-ot, de ebben az esetben is 15 % alatt marad. Az adott koncentráció szinten ezen értékek azt jelentik, hogy a módszer megfelelően pontos mérést tesz lehetővé.

Egy komponens kimutatási határa (LOD) az a koncentráció, amelyhez tartozó jel megegyezik a vakminta válaszejelének és a vakminta válaszejeléhez tartozó tapasztalati szórás háromszorosának összegével. A gyakorlatban elterjedt, hogy az LOD-t a kalibrációs egyenes extrapolációjával, a definícióban szereplő csúcsterülethez tartozó koncentráció értékek számításával adják meg. Az extrapolációból eredően azonban az ily módon meghatározott LOD értékek rendszerint kisebbek a legkisebb valóban kimutatható koncentrációnál. Ezért döntöttünk úgy, hogy az extrapoláció helyett egyre hígabb oldatok mérésével határozzuk meg az LOD-t. A 2. táblázatban szereplő LOD érték (1 ill. 2,5 ng/l) tehát annak a leghígabb oldatnak a koncentrációja, amelyben az adott komponens jele legalább akkora, amekkora megfelel az LOD definíciójának.

Az LOQ érték esetében amellet, hogy a jel/zaj arány meghaladja a tízet, fontosnak tartjuk, hogy ezen a ponton a mérés bizonyítottan megfelelő pontosságú legyen. Ezért az LOQ értékek egyben a kalibrációs tartomány alsó pontjai is. Az így kijelölt 5 ng/l-es LOQ a szabványos, LLE metodikával elérhető LOQ-val azonos nagyságrendbe esik.

2. Táblázat. A kidolgozott módszer főbb analitikai teljesítményjellemzői.

| | Kimutatási határ (LOD) / ng/l | A meghatározás alsó határa (LOQ) / ng/l | A meghatározás felső határa / ng/l | A kalibrációs egyenes meredeksége | A kalibrációs egyenes tengelymetszete | R ² | Torzítatlanság (%) | Ismételhetőség (RSD %) |
|----------------------|-------------------------------|---|------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|----------------|--------------------|------------------------|
| naftalin | 1 | 5 | 200 | 0,016 | 0,899 | 0,999 | 104,1 | 3,58 |
| 2-metil-naftalin | 1 | 5 | 200 | 0,011 | 0,095 | 0,998 | 115,0 | 7,70 |
| 1-metil-naftalin | 1 | 5 | 200 | 0,010 | 0,162 | 0,999 | 107,2 | 5,33 |
| acenaftilén | 1 | 5 | 200 | 0,016 | -0,021 | 0,998 | 94,17 | 13,2 |
| acenaftén | 1 | 5 | 200 | 0,020 | 0,037 | 0,999 | 90,07 | 6,14 |
| fluorén | 1 | 5 | 200 | 0,022 | 0,041 | 0,999 | 111,4 | 6,58 |
| fenantrén | 1 | 5 | 200 | 0,018 | 0,111 | 0,999 | 108,7 | 6,46 |
| antracén | 1 | 5 | 200 | 0,018 | -0,007 | 0,999 | 94,10 | 6,03 |
| fluorantén | 1 | 5 | 200 | 0,020 | 0,032 | 0,999 | 103,2 | 4,55 |
| pirén | 1 | 5 | 200 | 0,020 | 0,052 | 0,999 | 108,6 | 6,64 |
| benzo(a)antracén | 1 | 5 | 200 | 0,019 | -0,010 | 0,998 | 117,6 | 7,14 |
| krizén | 1 | 5 | 200 | 0,019 | 0,047 | 0,999 | 95,12 | 5,10 |
| benzo(b)fluorantén | 2,5 | 5 | 200 | 0,020 | -0,007 | 0,996 | 89,52 | 6,50 |
| benzo(k)fluorantén | 2,5 | 5 | 200 | 0,021 | 0,041 | 0,999 | 88,35 | 4,50 |
| benzo(a)pirén | 2,5 | 5 | 200 | 0,019 | -0,009 | 0,999 | 93,80 | 5,98 |
| dibenzo(a,h)antracén | 1 | 5 | 200 | 0,021 | 0,013 | 0,998 | 81,60 | 6,51 |
| benzo(g,h,i)perilén | 1 | 5 | 200 | 0,018 | 0,046 | 0,999 | 85,18 | 7,32 |

is. A 60- szoros átpumpálás ugyan soknak tűnhet, fontos azonban megjegyezni, hogy ezt a 60 átpumpálást, sőt a teljes

A végleges módszert alkalmazhatóságát valós mintákra PAH sztenderdekkel adalékolt csapvíz és felszíni vizek felhasználásával teszteltük. A vizsgálatok során bizonyítást nyert, a mátrix-komponensek ilyen típusú minták esetén nem terhelik meg túlzottan a csupán 2-3 mg-nyi töltetet. Ugyanez szennyvízmintáknál már vélhetően problémát okozna, akárcsak a sokkal nagyobb minta és töltet mennyiséggel működő SPE technikánál. A 3. ábán példaként egy, a PAH-okat 10 ng/ml koncentrációban tartalmazó adalékolt csapvízminta totálion kromatogramja látható.

A kidolgozott módszer különös előnye, hogy a méréshez csupán 1,5 ml mintára és mintánként 530 µl szerves oldószerre (210 µl izopropanol és 320 µl n-hexán) van szükség. A mintamennyiség tekintetében ez azt jelenti, hogy jelentősen csökkenthetők a mintaszállítási és tárolási költségek, hiszen a szükséges minta térfogata 2-3 nagyságrenddel kisebb, mint az LLE-nél és az SPE-nél, és kb. egy nagyságrenddel kisebb, mint a SPME-nél és az SBSE-nél. Szemben a SPME és az SBSE technikákkal a MEPS mintaelőkészítés nem kivitelezhető oldószerek alkalmazása nélkül még gázkromatográfias analízis esetén sem. Az összesen alig több mint 0,5 ml n-hexán és izopropanol alkalmazása még mindig jelentősen kisebb környezetterhelést jelent, mint a két nagyságrenddel nagyobb mennyiségű szerves oldószert igénylő LLE. A módszer további előnye az automatizáltsága. A minta-előkészítés elvégezhető például a sokoldalú, GC-hez csatlakoztatható Gerstel MPS2 automatával, mely az előkészített mintát egyúttal injektálja

minta-előkészítést az automata azon idő alatt végzi, míg a GC az előző mintát kromatografálja.

5. Összefoglalás

Az Elválasztástechnikai Kutató és Oktató Laboratórium által végzett módszerfejlesztések során az analitikai teljesítményjellemzők mellett minden esetben igyekszünk figyelembe venni a gazdaságossági és a környezetvédelmi szempontokat is. Ezeknek legkönnyebben úgy felelhetünk meg, ha a korábban már elért analitikai teljesítményt kevesebb mintából kevesebb oldószer felhasználásával, lehetőleg rövidebb idő alatt és automatizálva érjük el. PAH-ok vízmintából történő mérésénél a miniaturizált SPE-nek tekinthető MEPS technika mindezen elvárásoknak meg tud felelni. A minta-előkészítést a GC tetejére szerelt automata a kromatográfiás futás ideje alatt elvégzi. Miként azt a validálás során igazoltuk az általunk kidolgozott módszerrel 17 PAH vegyület 1,5 ml mintából 530 µl szerves oldószer felhasználásával a szabványos extrakciós módszerrel (LLE) azonos nagyságrendű kimutatási és meghatározási határ mellett határozható meg. A módszer szelektív, az 5-200 ng/ml tartományban lineáris, torzítatlan és precíz.

Köszönetnyilvánítás

Az ismertett módszerfejlesztés a KMOP-1.1.4-08/1-2008-0043 azonosító számú pályázat keretében, annak támogatásával valósulhatott meg

Hivatkozások

1. Simioli, P.; Lupi, S.; Gregorio, P.; Siwinska, E.; Mielzynska, D.; Clonfero, E.; Pavanello, S. *Mutat. Res.* **2004**, *562*, 103-110.
2. Mastrangelo, G.; Fadda, E.; Marzia, V. *Environ. Health Perspect.* **1996**, *104*, 1166-1170.
3. World Health Organization, *International Agency For Research On Cancer IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Volume 32 Polynuclear

Gas Chromatographic Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Small Sample and Solvent Amounts

The Joint Research and Training Laboratory on Separation Techniques (EKOL) is run by the Institute of Chemistry (Eötvös Loránd University) and WESSLING NCo. together. Its almost one decade long operation gives a remarkable example for involving company funds in the educational and research work of a University. Regarding research, EKOL can provide easily accessible analytical background for the work of other research groups. On the other hand EKOL itself is interested in developing new methods in the field of gas and liquid chromatography including sample preparation as well. Beside the classical analytical performance parameters (accuracy, reproducibility, limit of detection, etc.) we have always took an emphasis on economic and environmental aspects. Thus we often try to decrease sample and solvent usage. The determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in water samples by Microextraction by Packed Sorbent (MEPS) coupled to gas chromatography-mass spectrometry is an excellent example of this approach.

The group of PAHs is classified as one of the most dangerous organic pollutant primarily due to their mutagenic and carcinogenic features. By reason of the healthcare effect and the extensive emission PAHs are of great concern. According to the EPA method

- Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data.
4. *Toxicological Profile For Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, U.S. Department Of Health And Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
 5. Kanchanamayoon, W.; Tatrahun, N. *World Journal of Chemistry* **2008**, *2*, 51-54.
 6. Werres, F.; Balsaa, P.; Schmidt, T.C. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 2235-2240.
 7. Kabzinski, A.K.M.; Cyran, J.; Juszcak R. *Polish Journal of Environmental Studies* **2002**, *11*, 695-706.
 8. Ruey-an Doonga; Sue-min Chang; Yuh-chang Sunb *Journal of Chromatography A* **2000**, *879*, 177-188.
 9. Bianchin, J. N.; Nardini. G.; Merib. J.; Dias, A. N.; Martendal E.; Carasek, E. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1233*, 22-29.
 10. Eisert, R.; Levsen, K. *Journal of Chromatography A* **1996**, *733*, 143-157.
 11. Kinga, A.J.; Readmanb, J.W.; Zhoua, J.L. *Analytica Chimica Acta*, *2004*, *523*, 259-267.
 12. Prieto, A.; Zuloaga, O.; Usobiaga. A.; Etxebarria, N.; Fernandez, L.A. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1174*, 40-49.
 13. Roy, G.; Vuillemin, R.; Guyomarch, J. *Talanta* **2005**, *66*, 540-546.
 14. León, V.M.; Llorca-Pörce, J.; Álvarez, B.; Cobollo, M.A.; Munoz, S.; Valor, I. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *558*, 261-266.
 15. sge.com/products/meps
 16. Somaini, L.; Saracino, M.A.; Marcheselli, C.; Zanchini S.; Gerra, G.; Raggi, M. A. *Analytica Chimica Acta*, **2011**, *702*, 280-287.
 17. Vlcková, H.; Solichová, D.; Blaha, M.; Solich, P.; Novakova, L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2011**, *55*, 301-308.
 18. Noche, G. G.; Fernández Laespada, M. E.; Pérez Pavón, J. L.; Cordero, B. M.; Muniategui Lorenzo, S. *Journal of Chromatography A*, **2011**, *1218*, 9390-9396.
 19. gerstel.com
 20. Szekeres, Z.; Volk, G.; Eke, Z. *International Journal Of Environmental Analytical Chemistry* **2009**, *89*, 461-471.

3500 series the recommended sample preparation method is liquid-liquid extraction or solid phase extraction. These methods typically process 1 L of sample using relatively large amount of organic solvents. Besides, they are both time- and labour- consuming procedures, and availability of automation is restricted especially in combination with GC. In general these methods don't suit the expectations regarding economical as well as environmental aspects.

MEPS is a miniaturized version of solid phase extraction (SPE). 2-3 mg sorbent is incorporated in a syringe needle which can be coupled with 10-250 µl syringes. Sample aliquots are withdrawn through the sorbent by the syringe, the analytes adsorbed to the solid phase. The target compounds can be eluted by passing through clean solvents directly into the instrument's injector. From water samples the PAHs can be extracted efficiently by C8 sorbent. The highest enrichment factors with the lowest sample amount needed were achieved by the extraction 1.5 mL samples: The sorbent was conditioned with 200 µl n-hexane, i-propanol and water. For extraction 60 times 100 µl sample aliquots were pumped through it. PAHs were eluted with 3 x 40 µl hexane into a separate vial. Finally an appropriate aliquot of the hexane phase was injected into GC-

MS after phase separation. Thus the water remaining on the sorbent didn't cause nor elution neither chromatographic problems. The presented conditioning and elution technique ensures that carry over effect didn't take place.

To achieve further concentration we decided to use large volume injection. Instead of the classical solvent vent injection mode we applied a two step split-splittless technique which was developed in our laboratory just recently to facilitate the discrimination free large volume injection of target compounds with very different volatilities. With this naphthalene as well as benzo(g,h,i)perilene can be fully recovered with good peak shapes from 100 μ l injection.

Compared to the standardized liquid-liquid extraction the presented method uses two orders of magnitude smaller amounts of both sample and organic solvents. This means significantly decreased amount of waste as well as notably more efficient transportation and storage of samples. The linearity of the method was checked for 17 PAHs in the 5 ng/l-200 ng/l range. The relative standard deviation remained under 15% and the accuracy ranged from 80 to 120%. The method enabled the automation of all the sample preparation steps including the sample concentration elution and injection. These results prove that MEPS can be an outstanding alternative of the standardized method.