

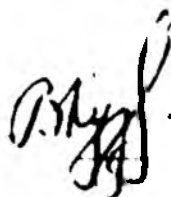
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

**Хромато-масс-спектрометрический анализ
состава водных растворов, содержащих
хлорированные соединения
после обработки
ультрафиолетовым излучением**

Методические указания

Министерство образования и науки Российской Федерации

ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ



УДТВЕРЖДАЮ
Декан ФФ ТГУ
В. М. Кузнецов
«03» июня 2010 г.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

**«Хромато-масс-спектрометрический анализ состава
водных растворов, содержащих хлорированные
соединения после обработки ультрафиолетовым
излучением»**

Методические указания

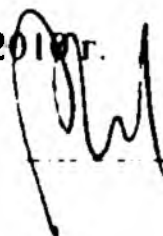
Томск
2010

УДК 543.51

Рассмотрено и утверждено методической комиссией физическо-го факультета

Протокол № 34 от «02» июня 2010 г.

Председатель комиссии



В.Н. Черепанов

Изложены рекомендации для выполнения лабораторной работы по исследованию состава водных растворов, содержащих гербициды после обработки ультрафиолетовым излучением эксимерных ламп методом хромато-масс-спектрометрии. Методические указания разработаны для магистрантов и студентов химических, биологических и физических специальностей в рамках курса «Межмолекулярные взаимодействия», работающих в области аналитической и физической химии, криминалистики и экологии.

Методическое пособие подготовлено при финансовой поддержке проекта ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы (госконтракт № П1128) и гранта президента РФ на поддержку ведущей научной школы (№ НШ-4297.2010.2). Лабораторная работа проводится на базе научно-образовательных центров Томского государственного университета «Физика и химия высокоэнергетических систем» и «Квантовая химия, спектроскопия и фотоника наноматериалов».

Составители: вед. н.с., д.ф.-м.н. Чайковская О.Н.
м.н.с. ТМ ЦКП Нарожная Л.Г.

Тема: Хромато-масс-спектрометрический анализ состава водных растворов, содержащих хлорированные соединения, после обработки ультрафиолетовым излучением

Цель работы: Изучение принципов работы и определение возможностей использования хромато-масс-спектрометрии для анализа состава водных растворов, содержащих загрязнители, после ультрафиолетового излучения эксиплексных ламп.

Задание:

1. Изучить теорию хромато-масс-спектрометрии.
2. Познакомиться с принципом работы хромато-масс-спектрометра *Finnigan Trace DSQ*.
3. Облучить водные растворы, содержащие хлорированные соединения ультрафиолетовым (УФ) излучением КгСl и ХеВг эксиплексных ламп в течение 15, 30 и 60 мин.
4. Провести пробоподготовку полученных образцов.
5. Получить хроматограммы.
6. Сопоставить полученных данных со спектрами из базы данных.
7. Проанализировать результаты.

В результате выполнения лабораторной работы студент должен:

Знать:

- физические явления, лежащие в основе метода исследования и контроля состава и структуры вещества;
- принцип работы и конструкцию устройств и прибора, используемого в данном методе исследования;
- практические возможности метода.

Уметь:

- проводить необходимые эксперименты;
- получать результаты, их обрабатывать и анализировать в рамках используемого метода;
- дать оценку использования полученных результатов в практических целях для разработки новых технологий очистки воды от хлорсодержащих соединений.

Теоретическая часть

Введение

Проблемы воды и водных ресурсов становятся в мире все более острыми. Особое беспокойство мировой общественности вызывает загрязнение чистой воды и связанные с этим проблемы здоровья и жизни людей. В природные воды хлорсодержащие органические соединения могут попадать в результате промышленных загрязнений и различных естественных биохимических процессов. Производные феноксиуксусной кислоты, относящиеся к классу гербицидов широкого действия, например, 4-хлор-2-метилфеноксиуксусная кислота (МСРА), применяются для обработки сельскохозяйственных территорий [1]. После обработки эти вещества в огромном количестве попадают в природные воды и влияют на процессы ремедиации. Согласно мировой экологической статистике многие хлорированные пестициды входят в группу экотоксикантов, составляющих так называемую "грязную дюжину" [2]. В природных условиях время полураспада МСРА в зависимости от концентрации токсиканта, влажности, кислородного режима и органического состава почвы составляет от двух недель до нескольких месяцев, причем сопровождается образованием токсичных хлорсодержащих промежуточных продуктов [2]. Известно, что процессы трансформации и разрушения органических веществ в экосистемах протекают под воздействием физико-химических и биологических факторов. Среди физико-химических процессов трансформации органических веществ, находящихся как в природных, так и в сточных водах, значительную роль играет фотолиз, как одна из современных природоохранных технологий [3]. Это обуславливает применение оптического излучения для решения проблем, связанных с охраной окружающей среды, в том числе для разложения экотоксикантов. Данные об устойчивости продуктов фототрансформации МСРА к дальнейшей биодеградации пока немногочисленны [4–7]. Однако в последние годы актуальным становится исследование эффективности новых источников УФ-излучения, позволяющих оказывать влияние на различные электронно-возбужденные состояния органических молекул. Такими источниками являются эксимерные лампы, которые находят все более широкое применение в области фотолиза токсикантов [8]. Воздействие ультрафиолетовым (УФ) излучением на растворы, содержащие хлорорганические соединения, также может привести к образованию продуктов, отличающихся от исходных

по степени токсичности и устойчивости к дальнейшему биологическому разложению [6, 9, 10]. Поэтому надежная интерпретация конечных продуктов фотоллиза хлорсодержащих соединений после УФ воздействия позволит установить механизмы их фотохимических превращений и выявить оптимальные условия их эффективного разложения.

Хромато-масс-спектрометрия в современном мире является наиболее распространенным методом определения хлорированных соединений. Кратко остановимся на основах хроматографии.

Основные понятия и определения

Хромато-масс-спектрометрия – метод анализа смесей органических и неорганических веществ и определения следовых количеств веществ в объеме жидкости [11]. Метод основан на комбинации двух самостоятельных методов – хроматографии и масс-спектрометрии. С помощью первого осуществляют разделение смеси на компоненты, с помощью второго – идентификацию и определение строения вещества, количественный анализ [12–17]. Обратимся к основам и особенностям каждого метода в отдельности.

Термин хроматографии был предложен русским ботаником и биохимиком Михаилом Цветом в 1906 г. Используя колонку, заполненную тонкодисперсным порошком карбоната кальция, и петролейный эфир, он сумел разделить окрашенные пигменты (хлорофилл и ксантофилл спириллоксантин) листьев растений. При этом наблюдал на колонке окрашенные зоны компонентов и поэтому назвал метод *хроматографией* (дословно «цветопись» – от греч. *Хρῶμα* «хрома» – цвет и «γραφ» – «пишу»). В основе хроматографии лежит процесс распределения разделяемых компонентов между двумя несмешивающимися фазами. Пробу вводят в *подвижную фазу*, которой может быть жидкость, газ или сверхкритический флюид. Подвижная фаза движется относительно *неподвижной фазы*, находящейся на колонке или в плоском тонком слое. Различия в силе взаимодействия компонентов пробы с неподвижной фазой приводят к тому, что при достаточно большом времени движения компоненты разделяются.

Принципиальным отличием хроматографических методов от других физико-химических методов анализа является возможность разделения близких по свойствам веществ. После разделения компоненты анализируемой смеси можно идентифицировать (устано-

вить природу) и количественно определять (массу, концентрацию) любыми химическими, физическими и физико-химическими методами. В соответствии с агрегатным состоянием элюента различают:

газовую хроматографию ГХ (англ. GC)

жидкостную хроматографию ВЭЖХ (англ. HPLC).

Газовая хроматография применяется для газов разделения, определения примесей вредных веществ в воздухе, воде, почве, промышленных продуктах; определения состава продуктов основного органического и нефтехимического синтеза, выхлопных газов, лекарственных препаратов, а также в криминалистике и т.д.

Жидкостная хроматография используется для анализа, разделения и очистки синтетических полимеров, лекарственных препаратов, детергентов, белков, гормонов и др. биологически важных соединений. Использование высокочувствительных детекторов позволяет работать с очень малыми количествами веществ ($10^{-11} \div 10^{-9}$ г), что исключительно важно в биологических исследованиях.

Различают колоночную и плоскостную хроматографию. В колоночной хроматографии сорбентом заполняют специальные трубки – колонки, а подвижная фаза движется внутри колонки благодаря перепаду давления. Разновидность колоночной хроматографии – капиллярная, когда тонкий слой сорбента наносится на внутренние стенки капиллярной трубки. Плоскостная хроматография подразделяется на тонкослойную и бумажную. В тонкослойной хроматографии тонкий слой гранулированного сорбента или пористая плёнка наносится на стеклянную или металлическую пластинки; в случае бумажной хроматографии используют специальную хроматографическую бумагу. Тонкослойная и бумажная хроматография используются для анализа жиров, углеводов, белков и др. природных веществ и неорганических соединений.

Полученную в результате этого выходную кривую называют хроматограммой. Для качественного хроматографического анализа определяют время от момента ввода пробы до выхода каждого компонента из колонки при данной температуре и при использовании определённого элюента. Для количественного анализа определяют высоты или площади хроматографических пиков с учётом коэффициентов чувствительности используемого детектирующего устройства к анализируемым веществам.

При анализе хроматограмм, а также грамотном планировании эксперимента необходимо знать и учитывать следующие параметры:

Время удержания – это время (в минутах), которое вещество находится в подвижной фазе колонки. Как правило, это величина зависит от молекулярной массы и свойств исследуемого вещества, свойств подвижной фазы (растворителя) и неподвижной фазы (покрытия капиллярной колонки). Для тяжелых веществ, с молекулярной массой выше 150 а.е.м. время удержания – более 15–20 мин. Легкие вещества выходят из колонки за 2–10 мин.

Объем удерживания вещества, V_R – объем подвижной фазы, затрачиваемой на элюирование пробы вещества. Объем удерживания определяют между точкой ввода пробы и точкой, при которой регистрируется максимум сигнала детектора. Эта характеристика необходима для расчета объема (в мкл) пробы, вводимой в прибор.

Фактор удерживания (коэффициент емкости), k' – один из основополагающих параметров удерживания в жидкостной хроматографии, безразмерная величина, характеризующая удерживание вещества и равная отношению абсолютного объема удерживания к свободному объему колонки

$$k' = V_R/V_0$$

Селективность α (относительное удерживание, $\alpha R/cm$, фактор разделения) хроматографической системы – избирательность, способность к специфическим взаимодействиям подвижной и неподвижной фазы с молекулами сорбата, обладающими определенными структурными признаками, приводящая к разной скорости перемещения концентрационных зон индивидуальных компонентов.

Количественно селективность выражается безразмерной величиной, равной отношению приведенного объема (времени) удерживания определенного вещества, взятого для сравнения (стандарта) и хроматографируемого в идентичных условиях:

$$\alpha R/cm = k_R/k_{cm} = t_R/t_{cm} = V_R/V_{cm}$$

k_R , t_R , V_R – характеристики удерживания вещества-стандарта

k_{cm} , t_{cm} , V_{cm} – характеристики удерживания вещества, хроматографируемого в идентичных условиях.

Селективность колонки зависит от многих факторов, варьируя которые можно подобрать оптимальные условия хроматографии интересующей экспериментатора смеси компонентов. Исходя из

химической природы разделяемых компонентов, хроматографист должен выбрать подходящий состав растворителя (подвижную фазу) и соответствующий по химической природе сорбент. Определенное влияние на селективность имеют и такие термодинамические факторы, как температура и давление в колонке, изменяющие коэффициенты распределения веществ между подвижной и неподвижной фазами.

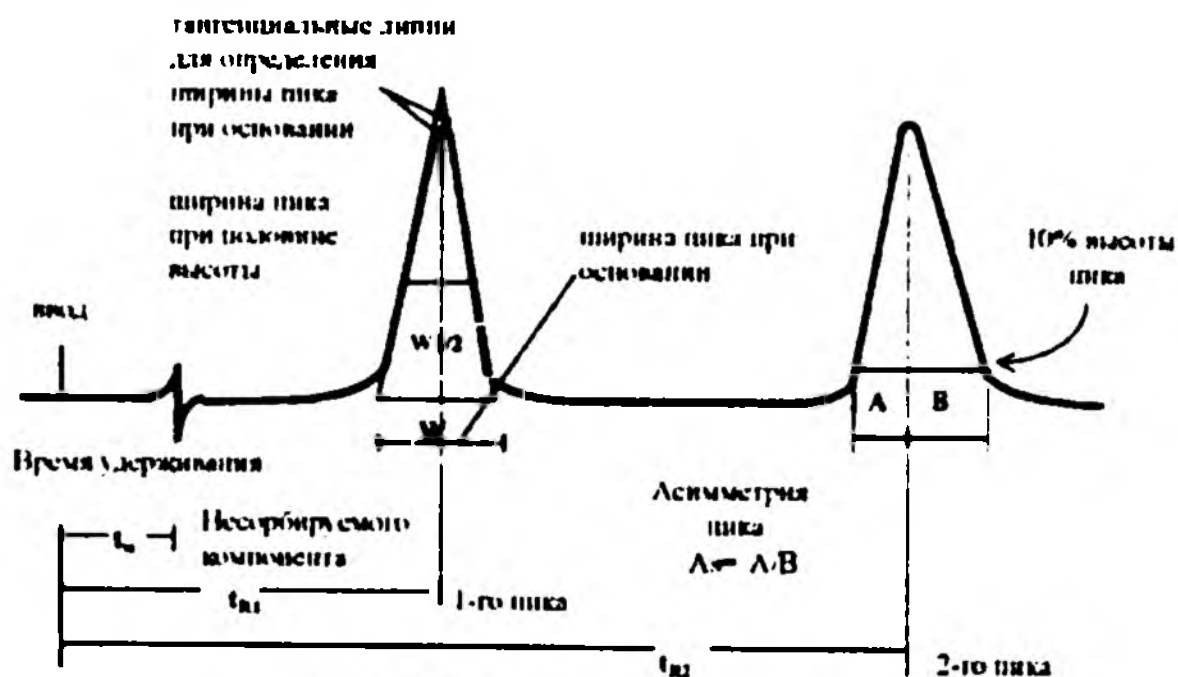


Рис. 1. Внешний вид хроматограммы

Масс-спектрометрия – является физико-химическим методом анализа, заключающемся в переводе молекул образца в ионизированную форму с последующим разделением и регистрацией образующихся при этом положительных и отрицательных ионов. Масс-спектр позволяет сделать вывод о молекулярной массе соединения, его составе и структуре. Масса самого тяжелого иона в спектре равна молекулярной массе анализируемого соединения. Принято представлять масс-спектр в виде графического изображения по оси абсцисс откладывается величина отношения иона к его заряду (m/z), а по оси ординат – их интенсивности, т.е. относительное количество ионов данного вида. Ввиду квантования массы и заряда типичный масс-спектр является дискретным. Для получения масс-спектра прежде всего необходимо ввести образец в источник ионов, затем перевести его молекулы в заряженную форму, разделить эти ионы по массам и зарегистрировать их массы и количество.

История масс-спектрометрии начинается с начала XX века с основополагающих опытов физиков В. Крауфмана, который создал прототип параболического масс-спектрографа для изучения катодных лучей, Дж. Томсона, который впервые увидел спектрально изотопы неона, А. Демпстера, сконструировавшего первый магнитный масс-спектрометр с источником для электронной и термической ионизации. Существенное отличие масс-спектрометрии от других аналитических физико-химических методов состоит в том, что оптические, рентгеновские и некоторые другие методы детектируют излучение или поглощение энергии молекулами или атомами, а масс-спектрометрия непосредственно детектирует сами частицы вещества. Масс-спектрометрия в широком смысле – это наука получения и интерпретации масс-спектров, которые в свою очередь получают при помощи масс-спектрометров. Масс-спектрометр – это вакуумный прибор, использующий физические законы движения заряженных частиц в магнитных и электрических полях, и необходимый для получения масс-спектра.

Природа анализируемого вещества, особенности метода ионизации и вторичные процессы в масс-спектрометре могут оставлять свой след в масс-спектре (метастабильные ионы, градиент ускоряющего напряжения по местам образования ионов, неупругое рассеивание). Так ионы с одинаковыми отношениями массы к заряду могут оказаться в разных частях спектра и даже сделать часть его непрерывным. Поэтому масс-спектр в широком смысле – это нечто большее, несущее специфическую информацию, и делающее процесс его интерпретации более сложным и увлекательным.

Ионы бывают однозарядные и многозарядные, причём как органические, так и неорганические. Большинство небольших молекул при ионизации приобретает только один положительный или отрицательный заряд. Атомы способны приобретать более одного положительного заряда и только один отрицательный. Белки, нуклеиновые кислоты и другие полимеры способны приобретать множественные положительные и отрицательные заряды.

Атомы химических элементов имеют специфическую массу. Таким образом, точное определение массы анализируемой молекулы, позволяет определить её элементный состав. Масс-спектрометрия также позволяет получить важную информацию об изотопном составе анализируемых молекул. В органических веществах молекулы представляют собой определённые структуры, образованные атомами. Природа и человек создали поистине неисчис-

лимое многообразие органических соединений. Современные масс-спектрометры способны фрагментировать детектируемые ионы и определять массу полученных фрагментов. Таким образом, можно получать данные о структуре вещества.

Устройство хромато-масс-спектрометра *Finnigan Trace DSQ*

Хромато-масс-спектрометра *Finnigan Trace DSQ* является прибором, в котором масс-спектрометрическая часть комбинируется с газовым хроматографом, в котором разделение веществ проводится с помощью капиллярной колонки (рис. 2).

Хромато-масс-спектрометра *Finnigan Trace DSQ* относится к серии приборов с квадрупольными масс-анализаторами, системой химической ионизации и программируемой системой прямого ввода образца в ионный источник. Подобный набор технических возможностей позволяет использовать прибор в большом спектре практических задач.

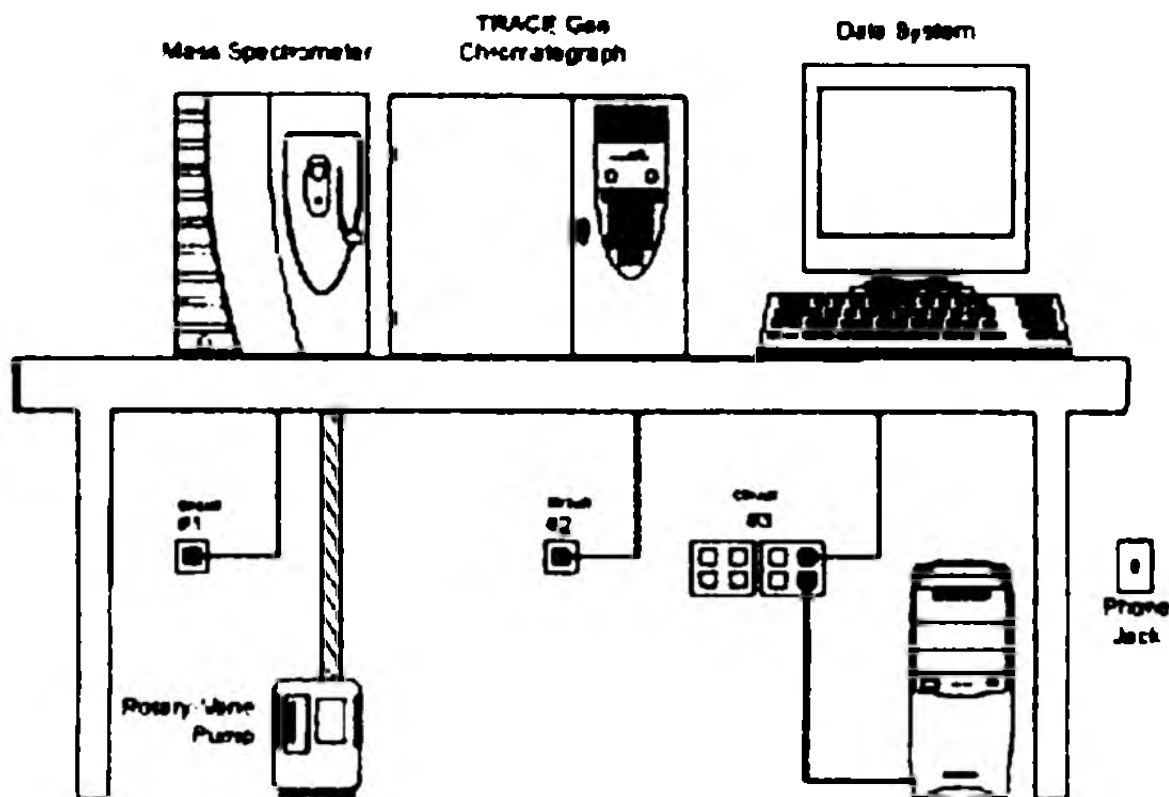


Рис. 2. Схема устройства хромато-масс-спектрометра

Mass-spectrometer – масс-спектрометрическая часть; *TRACE Gas chromatograph* – хроматографическая часть; *Data system* – компьютер, электронная библиотека данных; *Rotary-Vane pump* – диффузионный насос; для создания вакуума в масс-спектрометрической части прибора.

Данная модель хромато-масс-спектрометра позволяет проводить ионизацию вещества двумя методами – методом электронного удара и методом химической ионизации. Метод химической ионизации используется в том случае, когда необходимо получить именно молекулярный ион и сила «удара» по молекуле должна быть невелика. В данном случае такой задачи не стоит, и мы используем как способ ионизации электронный удар силой 70 В.

Хроматограф предназначен для разделения смесей и состоит из следующих основных частей:

1. Блок подготовки газов с системой очистки.
2. Блок нагрева-термостатирования с капиллярной колонкой.
3. Блок ввода пробы с испарителем (инжектором). После разделения смеси компоненты пробы переносятся в масс-спектрометр по вспомогательному переходнику.

Масс-спектрометр состоит из следующих частей:

1. Молекулярный сепаратор, предназначенный для компенсации разницы давлений (на выходе из колонки давление составляет 10^5 Па, на входе в масс-спектрометр 10^{-6} Па).
2. Камера источника ионов.
3. Предварительный фильтр.
4. Квадрупольный фильтр.
5. Детектор.

Общие требования к проведению хроматографического анализа

К технике выполнения любых хроматографических определений предъявляются некоторые общие требования. Прежде всего, необходимо отметить те из них, которые вызывают у начинающих специалистов больше всего вопросов.

1. *Кондиционирование помещения.* В помещении, где установлен хроматограф, не должно быть резких колебаний температуры. Изменение температуры может привести к изменению удерживания, эффективности и селективности разделения.

2. Качество электропитания. Современные хроматографы требуют систему стабилизации электропитания.

3. Чистота растворителей. Для приготовления подвижных фаз следует применять особо чистые растворители.

4. Дегазация растворителей. Растворители, применяющиеся в хроматографии для приготовления подвижных фаз, обычно содержат растворенный воздух. При работе пузырьки воздуха попадают в различные узлы системы: насос, колонку, капилляр, детектор и приводят к появлению на хроматограмме высоких периодических шумов, вызванных колебанием давления в жидкостной системе. Это приводит к резкому уменьшению чувствительности анализа. Существуют три основных способа дегазации подвижных фаз:

а) дегазация вакуумом, элюент выдерживают в колбе Кляйзена под вакуумом водоструйного насоса в течении нескольких минут;

б) термическую дегазацию применяют для водноорганических элюентов с высокой долей воды в негерметично закрытой колбе на водяной бане при температуре около 50 °С. Через 10–15 мин колбу герметично закрывают и охлаждают под струей воды до комнатной температуры;

в) дегазация ультразвуком в течении нескольких минут, а затем дают отстояться в течение 10–15 мин. Этот метод не достаточен для водноорганических растворителей.

5. Фильтрация подвижной фазы. Для обеспечения бесперебойной работы насоса подвижную фазу фильтруют под вакуумом с применением мембранного фильтра.

6. Промывка колонки и узлов системы. После перехода с одной серии растворов на другую или при обнаружении в хроматографическом спектре «грязи» необходимо промыть колонку несколькими растворителями (ацетонитрилом, бензолом, эфиром) и конденсировать при температуре около 200 °С в течении 40 мин.

7. Переход на новую подвижную фазу, которая не смешивается с предыдущей осуществляется через промежуточный растворитель, обычно, через изопропанол или ацетон.

8. Фильтрация пробы. Если анализируемая проба содержит нерастворенную взвесь, то ее нужно отфильтровать.

9. Консервация хроматографических колонок. Перед достаточно длительным хранением колонка промывается и заполняется растворителем.

10. Регулярность проведения калибровки по стандарту.

Оборудование

1. Хромато-масс-спектрометр квадрупольный. Колонка *Trace TR-5 MS*. Шприцы из набора, прилагающегося к ХМС.
2. Спектрофлуориметр СМ 2203 для контроля концентрации гербицида и его фотопродуктов.
3. Набор дозаторов.
4. Воронка делительная цилиндрическая ВД-1-500.
5. Весы аналитические OHAUS AR-2140.
6. Бытовой холодильник с морозильным отделением.
7. Набор колб.
8. Эксилампы КгС1 и ХеВг.
9. Ультразвуковая лабораторная установка ИИ100-6/1 или ванна ультразвуковая УЗВ-1,3.
10. Мешалка магнитная с подогревом ПЭ6110 или перемешивающее устройство ЛАБ-ПУ-02.
11. Вытяжной шкаф.

Реактивы и материалы

1. Гербицид *4-chloro-o-tolyloxyacetic acid* (МСРА), химическая чистота 95 % фирмы «ALDRICH», Code: 261866-56 01429AO.
2. Вода дистиллированная.
3. Диэтиловый эфир марки «хч» для хроматографии.
4. 5 % водный раствор HCl.
5. Сульфат натрия безводный марки «чда».
6. Халат, резиновые перчатки и маска.
7. Очки для защиты глаз от УФ излучения.
8. Индикаторы pH среды.

Источники ошибок

1. Неверное приготовление растворов
2. Неверный выбор режима работы прибора (вещество может не разделиться, или выйти «нево время»)
3. Ошибки в пробоподготовке
4. Систематические ошибки весов, лабораторной посуды, шприцов
5. Случайные ошибки оператора при вводе пробы в ХМС, работе с эксилампами.

Техника безопасности при выполнении работы

Опасность представляют концентрированный раствор кислоты, эфир и использование электроприборов.

1. Приготовление растворов, их экстракцию и выпаривание проводить в вытяжном шкафу и в резиновых перчатках.
2. Перед началом работы необходимо убедиться в исправности приборов и наличии защитного заземления.
3. Обязательно проверить показание манометра на баллоне с гелием, определить количество газа и возможность проведения работ

Оценка необходимой степени точности

Данные физических или химических измерений неизбежно включают некоторые ошибки или погрешности. Результатом отдельного экспериментального наблюдения является *измеряемое* значение X . Разность между X и *истинным* значением X_0 данной величины представляет собой ошибку конкретного измерения. На практике, однако, невозможно выполнить бесконечно большое число измерений. Точность результата чаще всего выражают с помощью *стандартного отклонения* s , которое представляет собой квадратный корень из второго момента распределения относительно среднего значения и является мерой точности результатов измерения. Стандартное отклонение вычисляется по формуле:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{N-1}},$$

где X_i – конкретное измеряемое значение; \bar{X} – среднее арифметическое значение; N – число измерений.

Перед проведением количественного анализа и оценкой нижних пределов количественного определения необходимо провести калибровку. Согласно современной литературе, критическим уровнем обнаружения L_C называется такой сигнал, выше которого мы уже не можем сказать, что в растворе присутствует вещество с концентрацией x_C . Пределом обнаружения L_D называется сигнал, соответствующей такой концентрации вещества x_D , которую называют минимально обнаруживаемой концентрацией. Пределом количественно-

го определения L_Q называют сигнал, точность которого удовлетворяет заранее заданному уровню.

Анализ начинается с последовательного введения в прибор серии стандартных растворов, с точно известным содержанием соединения (МСРА: 10^{-3} М, 10^{-4} М, 10^{-5} М), которые планируются исследовать. Обычный концентрационный диапазон составляет 2 + 3 порядка. В этом диапазоне зависимость регистрируемого отклика от концентрации линейна, т.е. фактор отклика должен быть постоянным:

$$R_F = \frac{I_{is} \times M_x}{I_x \times M_{is}},$$

где R_F – фактор отклика; M – количество соединения, в данном стандартном растворе; I – интенсивность сигнала соединения, индекс is – относится к стандарту, индекс x – к определяемому соединению. Для получения достоверных результатов фактор отклика должен быть как можно ближе к единице. Расчет количества анализируемого вещества в пробе осуществляется по формуле

$$M = R_F \frac{S \times M_{is}}{S_{is}}, \quad (1)$$

где M – количество анализируемого соединения в пробе; S – площадь пика анализируемого вещества, M_{is} – количество введенного стандарта; S_{is} – площадь пика стандарта.

Порядок выполнения работы

Когда концентрации анализируемых веществ малы, для обеспечения пределов обнаружения проводят концентрирование пробы. В данном конкретном случае, концентрирование необходимо, чтобы обнаружить следы исследуемого гербицида при низких концентрациях в пробе, а также продукты его фотохимических превращений.

1. Приготовление раствора гербицида. Рассчитать молекулярную массу МСРА. Приготовить 100 мл водного раствора 10^{-3} М МСРА из сухой навески. Раствор перемешать, затем колбу с раствором поставить в ультразвуковую ванну на 15 мин. Через 1 час перемешивание повторить. Убедиться, что МСРА полностью растворился. Для этого получить спектры поглощения разбавленного раствора МСРА по стандартной методике на приборе СМ 2203. Убедиться,

что значение молярного коэффициент экстинкции длинноволновой полосы МСРА $\epsilon = 1600$ л/моль см.

2. УФ облучение. Эксперимент проводится при комнатной температуре в режиме перемешивания раствора. По 50 мл раствора 10^{-3} М МСРА облучить КгСІ и ХеВг эксилампами (рис. 3 и 4) в течение 30 мин. Для этого раствор МСРА перелить из колбы в стеклянный стакан и поставить на механическую мешалку на расстояние 5 см от эксилампы. Включить мешалку. Надеть очки и включить лампу. Закрывать шторку.

3. Пробоподготовка. Для определения состава и концентрации продуктов фотолиза МСРА полученные пробы предварительно подкисляли НСІ до pH = 1 и экстрагировали диэтиловым эфиром. Затем экстракты выпаривали в токе воздуха до объема 0,5 мл.

4. Условия анализа на хромато-масс-спектрометре. Колонка *Trace TR-5 MS*, температура 100 °С (5 мин), нагрев 10 °С/мин до 180 °С (5 мин), нагрев 100 °С/мин до 300 °С (1 мин), детектор *MS*, газ-носитель гелий.

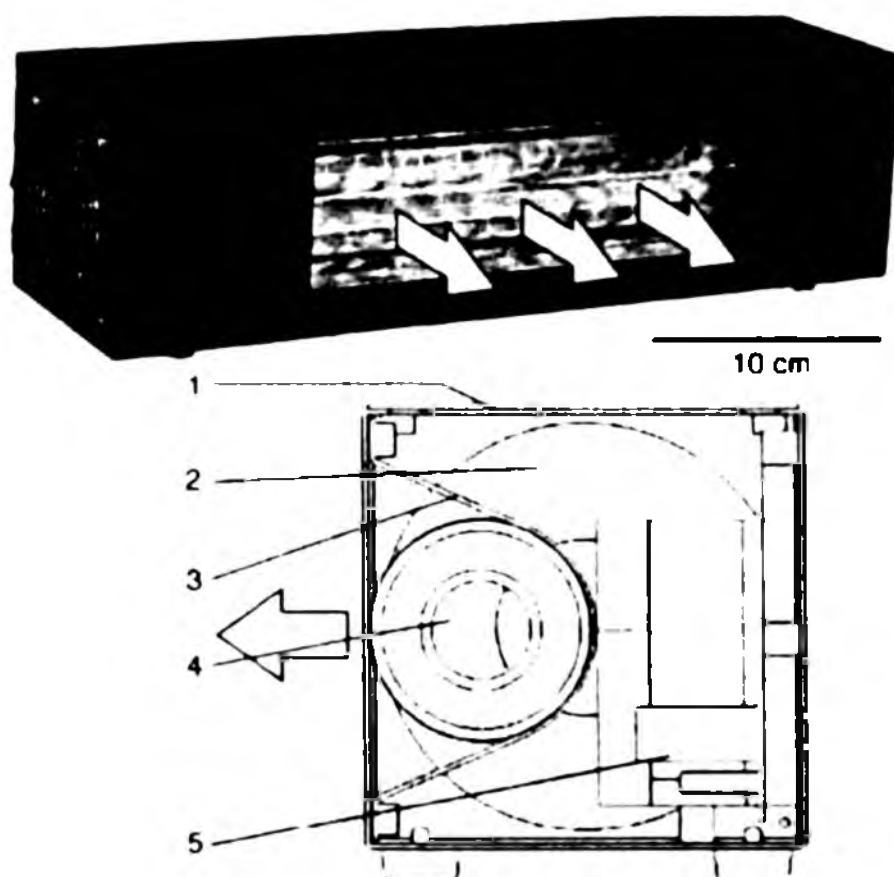


Рис. 3. Внешний вид эксилампы емкостного разряда: 1 – корпус; 2 – вентилятор; 3 – рефлектор; 4 – эксилампа; 5 – блок питания. Белые стрелки показывают направление светового излучения

Ввести в программу работы прибора необходимые параметры:

- a) температура источника ионов (обычно 200–250 °С), (Приложение, рис. 5);
- b) температура переходной линии (обычно задается равной конечной температуре нагрева термостата), (Приложение, рис 6);
- c) температура инжектора (обычно 200–250 °С),
- d) начальную и конечную температуру нагрева термостата (с указанием времени выдержки при каждой из них);
- e) скорость нагрева;
- f) необходимость разбавления пробы газом-носителем в блоке ввода пробы (в лайнере).

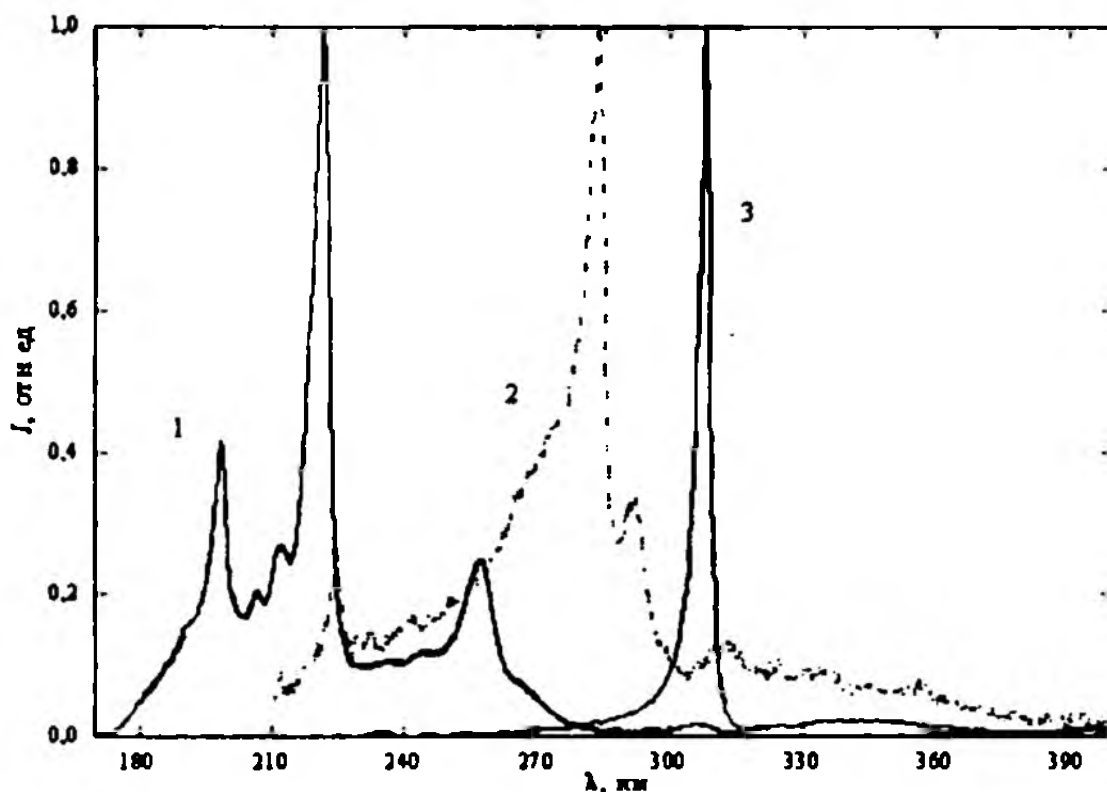


Рис. 4. Спектр излучения эксилламп: 1 – K₂Cl; 2 – XeBr; 3 – XeCl

5. Ввести пробу в инжектор:

- a) набрать необходимый объем пробы в шприц, убедившись, что в нем отсутствуют пузырьки воздуха (ввод воздуха в прибор приводит к порче детектора масс-спектрометрической части прибора);
- b) дождаться момента, когда прибор будет готов к вводу пробы, т.е. все рабочие части прибора нагреются до требуемой

температуры (на панели прибора зажжется зеленая лампочка);

с) ввести пробу, нажать кнопку «СТАРТ».

6. Проанализировать полученные хроматограммы. Анализ результатов измерений проводится в соответствии с начальными задачами эксперимента с использованием библиотеки спектров ХМС *Finnigan Trace DSQ*:

а) в полученной хроматограмме выделяются пики относительно высокой интенсивности;

б) рассматриваются масс-спектры, соответствующие нескольким точкам выделенных пиков;

с) полученные масс-спектры сравниваются с масс-спектрами электронной библиотеки программного обеспечения ХМС *Finnigan*.

7. Поиск пиков фотопродуктов МСРА на общей хроматограмме. Определение маленьких пиков неизвестных компонентов – чрезвычайно сложная задача. Обычно аналитику остается исследовать общую хроматограмму ионного тока, разыскивая небольшие отклонения от сильного сигнала базовой линии.

Корректность определения качественного состава определяется наличием в получившейся хроматограмме ясно выраженных пиков относительно высокой интенсивности (Приложение, рис. 7), а также соответствием масс-спектров анализа масс-спектрам электронной библиотеки прибора с большой вероятностью. На хроматограмме в различных частях хроматографического пика (в максимуме, в начале и в конце) выбирается время удержания и при этом времени смотрится масс-спектр (Приложение, рис. 8). Компьютерная программа автоматически подбирает из электронной библиотеки масс-спектр известного вещества, наиболее похожего на масс-спектр исследуемого соединения. Эти два спектра сравниваются. Всего находится около 40 таких похожих масс-спектров. Далее программа вычисляет вероятность совпадения масс-спектра исследуемого вещества с масс-спектрами электронной библиотеки и выводит эту информацию на экран. Поскольку невозможно добиться абсолютного отсутствия шума, кроме того, в растворе могут присутствовать другие органические вещества, вероятность совпадения никогда не равна 100 % или 98 %. Поэтому вероятность совпадения масс-спектра исследуемого вещества с масс-спектром известного вещества из электронной библиотеки с вероятностью более 75 % считается необходимым и достаточным для идентификации вещества.

На экране четыре «окна» – в верхнем левом приводятся данные о названии веществ с похожими масс-спектрами из электронной библиотеки, здесь выбирается наиболее подходящий масс-спектр. В верхнем правом – структура выбранного вещества, В нижнем левом – сравнение библиотечного масс-спектра с масс-спектром, полученном на приборе, в нижнем правом – разница между этими двумя спектрами.

8. Количественная оценка содержания фотопродуктов в исследуемой пробе. Оценка количественного содержания фотопродуктов МСРА в исследуемой пробе проводится путем сравнения площадей хроматографических пиков, принадлежащих искомым веществам после различных фоторепревращений:

а) найти на хроматограмме пик, принадлежащий искомому фотопродукту (с помощью электронной библиотеки);

б) выделить площадь исследуемого пика. Для этого на панели управления использовать «иконку» «*Add Peaks*» (рис. 9);

с) на панели управления зайти в опцию «*Display/ Display Options/Labels*» (Приложение, рис. 10), выделить необходимые искомые параметры (*Area, Height*), вычислить площадь пика (Приложение, рис. 11);

д) путем математического сравнения вычислить отношение количеств фотопродуктов;

е) указать в масс-спектре найденных соединений наиболее интенсивные пики, которые связаны с молекулой и ее наиболее значимыми осколочными ионами;

ф) данные занести в табл. 1 и 2;

г) найти ошибку измерения. Для этого в колонку ввести пробы МСРА с известной концентрацией: 10^{-3} М, 10^{-4} М, 10^{-5} М. Для каждой концентрации в колонку вводиться три пробы с объемами: 10, 20 и 30 мкл. Вычислить фактор отклика. В табл. 3 занести расчет количества анализируемого вещества в пробе по формуле (1).

Контрольные вопросы

1. Теория хроматографического разделения. Основной принцип разделения веществ в хроматографической колонке.

2. Принцип работы ХМС. Что является определяющими факторами при выборе режима работы ХМС. Требования к вводимым в ХМС пробам

3. Как можно осуществить идентификацию определяемых соединений в смеси после их хроматографического разделения.

Таблица 1

Динамика появления и убыли фотопродуктов при УФ воздействии в водном растворе МСРА (по высоте пиков в хроматограмме, млн. усл. ед.)

Соединение	КгСl эксилампа			ХеВг эксилампа		
	Время воздействия, мин					
	15	30	60	15	30	60
Фотопродукт 1						
Фотопродукт 2						
Фотопродукт 3						
Фотопродукт 4						
Фотопродукт 5						
Фотопродукт 6						
Фотопродукт 7						

Таблица 2

Время удерживания (R), структура и масс-спектры фотопродуктов (Ф) МСРА

Соединение	R, мин	Структура и масс-спектр фотопродукта	
Ф ₁			
Ф ₂			
Ф ₃			
Ф ₄			

Таблица 3

Динамика убыли МСРА в воде после УФ воздействия (по площади пиков в хроматограмме, млн. усл. ед.), М – количество анализируемого вещества

№	М							
	КгСl эксилампа				ХеВг эксилампа			
	Время воздействия, мин							
	0	15	30	60	0	15	30	60
1								
2								
3								

Список литературы

1. Ермаков В.В. Газохроматографические методы определения пестицидов в биологических объектах. – М.: Наука, 1972. – 168 с.
2. Helweg M. Degradation of Mecoprop and Isoproturon in Soil Influence of Initial Concentration // Weed research. – 1987. – V. 27. – No. 4. – P. 287–296.
3. Лунев М.И. Пестициды и охрана агрофитоценозов. – М.: Колос, 1992. – 269 с.
4. Федорова Л.М., Белова Р.С. Производные хлорфеноксисукусных кислот и охрана окружающей среды. – Саратов: СГУ, 1983. – 124с.
5. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. – М.: Химия, 1984. – 448 с.
6. Nicolaisen M.H., Bælum J., Jacobsen C.S. Sorensen J. TaqMan Probe-Based Real-Time PCR Assay for Detection and Discrimination of Class I, II, and III *tfdA* Genes in Soils Treated with Phenoxy Acid Herbicides // Environmental Microbiology. – 2008. – No. 10. – P. 571–579.
7. Тинсли И. Поведение химических загрязнителей в окружающей среде./ Пер. с англ. – М.: Мир, 1992. – 281 с.
8. Oppenlander T. Photochemical Purification of Water and Air. – Weinheim.: WILEY-VCH Verlag, 2003. – 368 p.
9. David B., Boule P. Phototransformation of hydrophobic pollutants in aqueous media // Chemosphere. – 1993. – V. 26. – P. 1617–1631.
10. Кислин Е. Н. Определение природных фитогормонов с помощью хроматографических методов учебно-методическое пособие. – СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. – 234 с.
11. Хмельницкий Р.А. Хромато-масс-спектрометрия. – М.: Химия, 1984. – 345 с.
12. Полякова А.А. Молекулярный масс-спектральный анализ органических соединений. – М.: Химия, 1983. – 123 с.
13. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М.: БИНОМ. Лаб. знаний, 2003. – 324 с.
14. Пентин Ю.А., Вилков Л.В. Физические методы исследования в химии. – М.: Мир, 2006. – 683 с.
15. Основы аналитической химии. В двух книгах. / Под редакцией Золотова Ю.А. – М.: Высшая школа, 2002. – 745 с.
16. А.Т. Лебедев. Масс-спектрометрия в органической химии. М.: БИНОМ, 2003. 493 с.
17. Лавиньини И., Маньо Ф., Сералья Р., Тральди П. Количественные методы в масс-спектрометрии. – М.: Техносфера, 2008. – 176 с.

Хроматографические термины

- * **Колонка** – содержит хроматографический сорбент, выполняет функцию разделения смеси на индивидуальные компоненты.
- * **Элюент** – подвижная фаза: газ, жидкость или (реже) сверхкритический флюид.
- * **Хроматограмма** – результат регистрирования зависимости концентрации компонентов на выходе из колонки от времени.
- * **Детектор** – устройство для регистрации концентрации компонентов смеси на выходе из колонки.
- * **Хроматограф** – прибор для проведения хроматографии.
- * **Дериватизация** – это получение производных анализируемого вещества, обладающих иными, лучшими с точки зрения используемого метода, аналитическими свойствами (например, иным спектром электронного поглощения, флуоресценцией, термической стабильностью, летучестью и пр.).
- * **Адсорбент** (неподвижная фаза) - твердое вещество, способное удерживать растворенные вещества и используемые в хроматографии для заполнения хроматографических колонок.
- * **Проба** – аликвота анализируемой смеси, вводимая в хроматограф.
- * **Сорбат** – компонент пробы, индивидуальное соединение.
- * **Нагрузка колонки** – количество вещества в пробе. При введении в хроматограф большого объема пробы или концентрированной пробы может возникнуть ПЕРЕГРУЗКА колонки, которая выражается уширением и искажением формы пика, а также зависимостью удерживания от вводимого количества вещества. На практике желательно работать при небольших нагрузках колонки.
- * **Элюат** – раствор, выходящий из хроматографической колонки.
- * **а.е.м.** – атомная единица массы.

Приложение

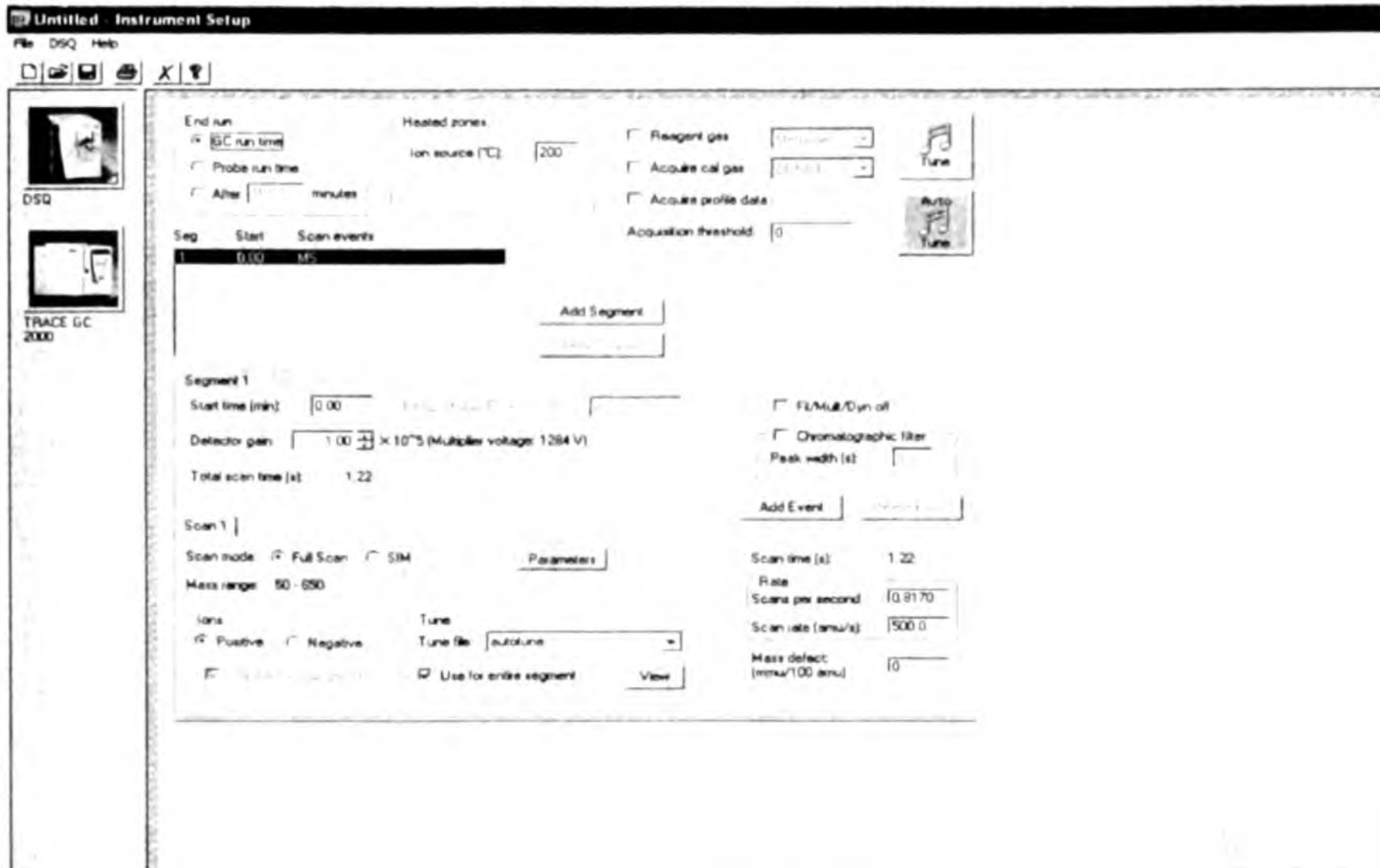


Рис. 5. Задание параметров для масс-спектрометрической части прибора

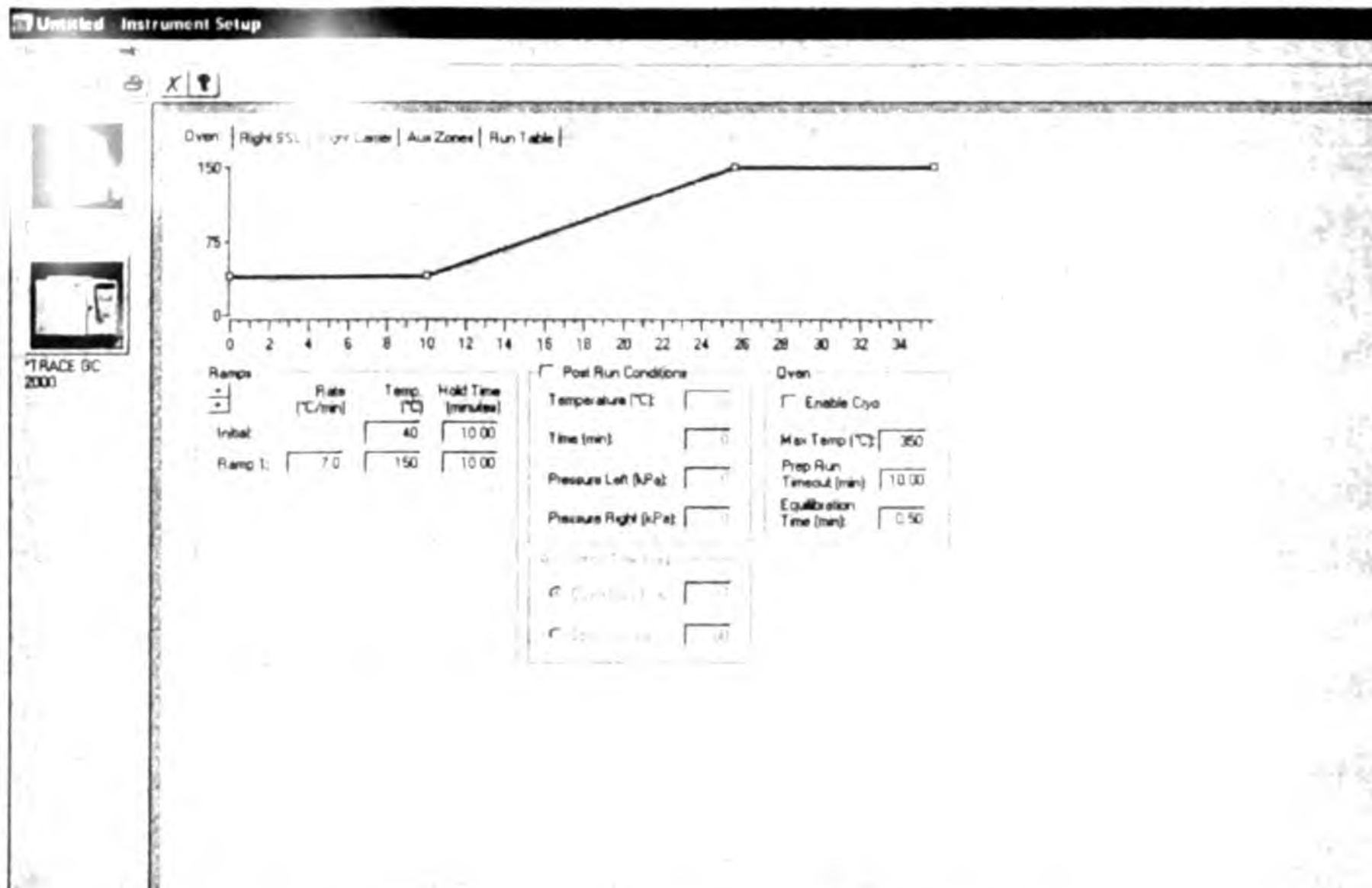


Рис. 6. Задание параметров для хроматографической части прибора

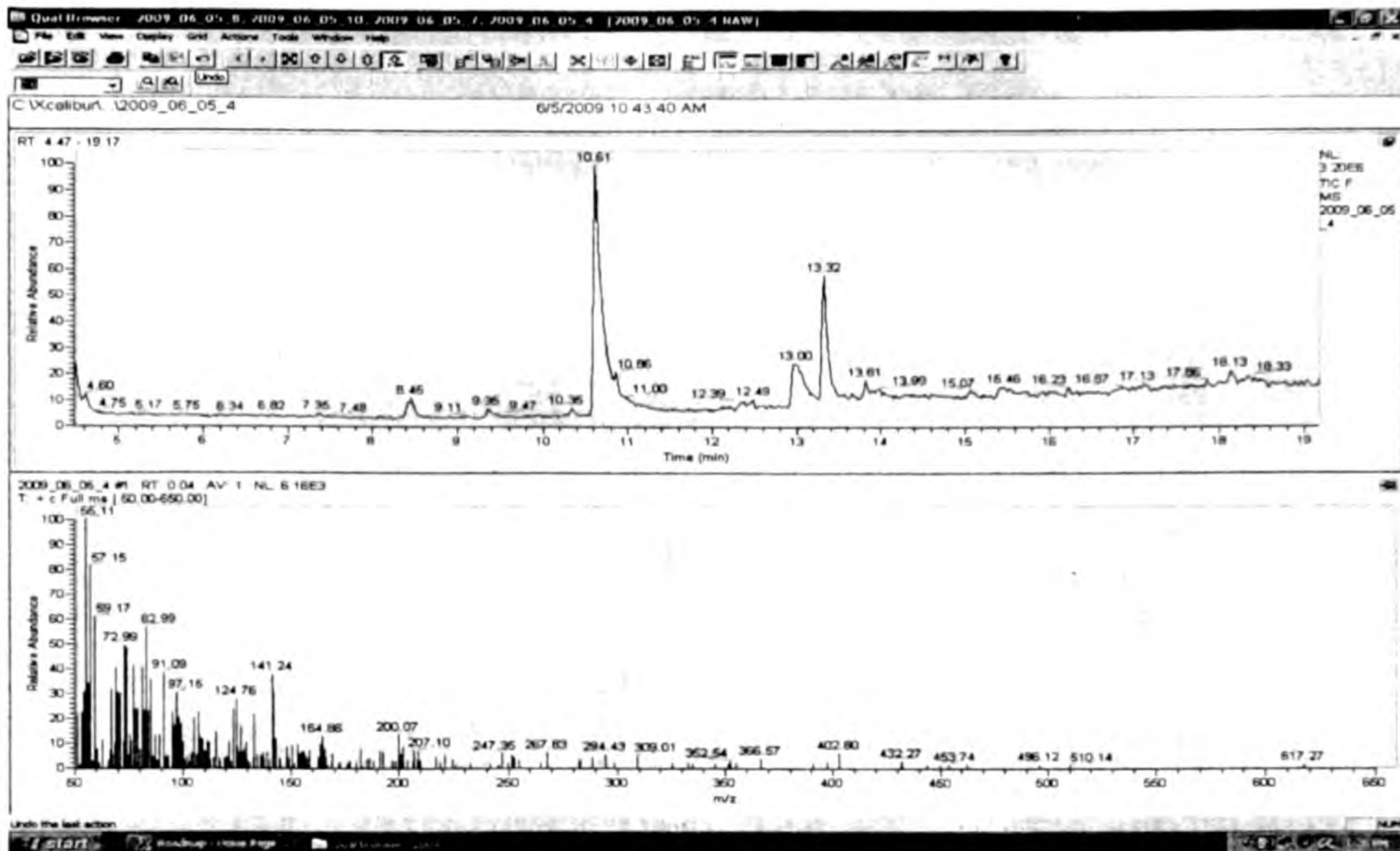


Рис. 7. Хроматограмма и масс-спектр исследуемых веществ. Выбранный масс-спектр соответствует времени удержания 0,04 мин (RT: 0,04)

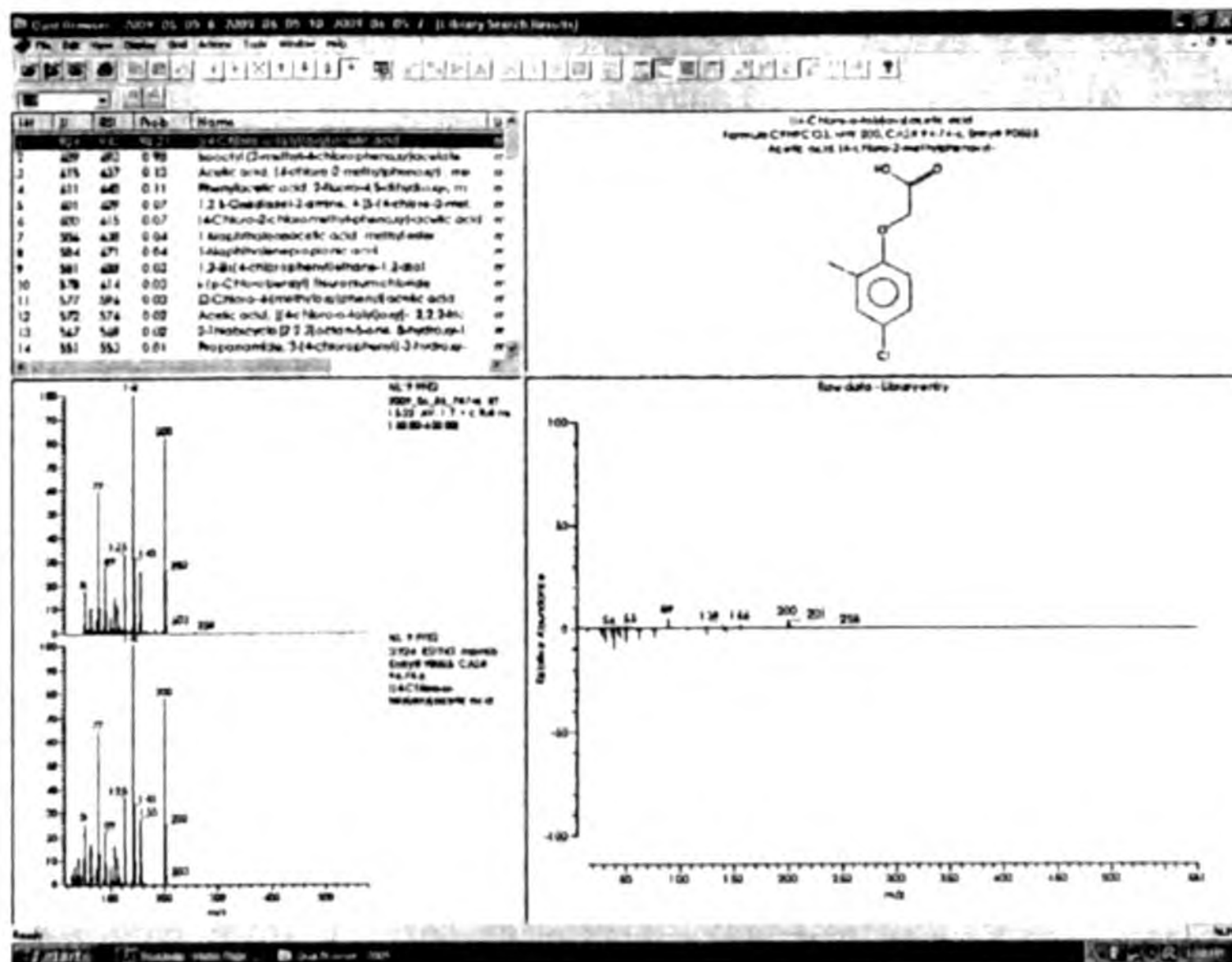


Рис. 8. Данные электронной библиотеки

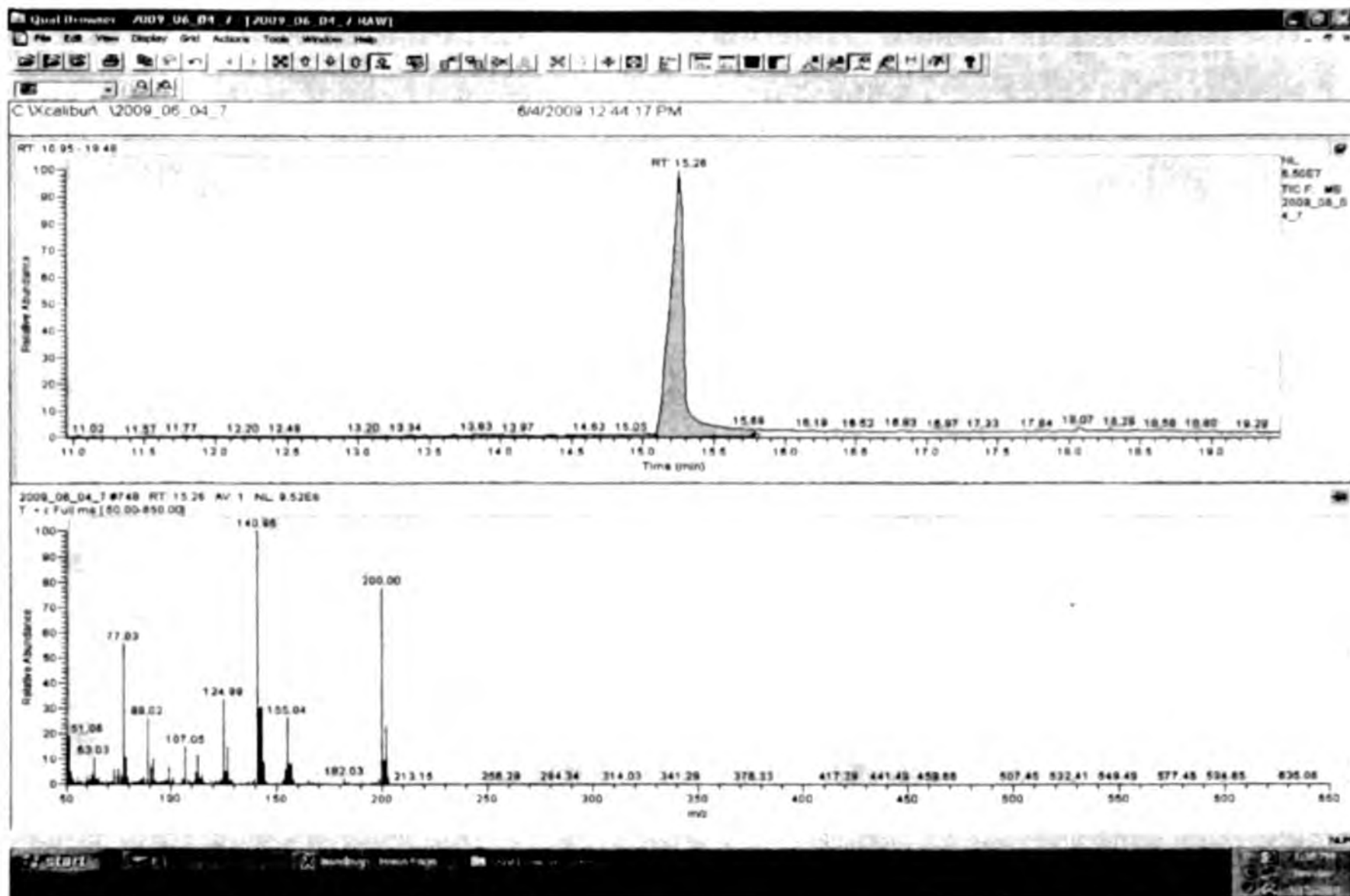


Рис. 9. Выделение пика на хроматограмме

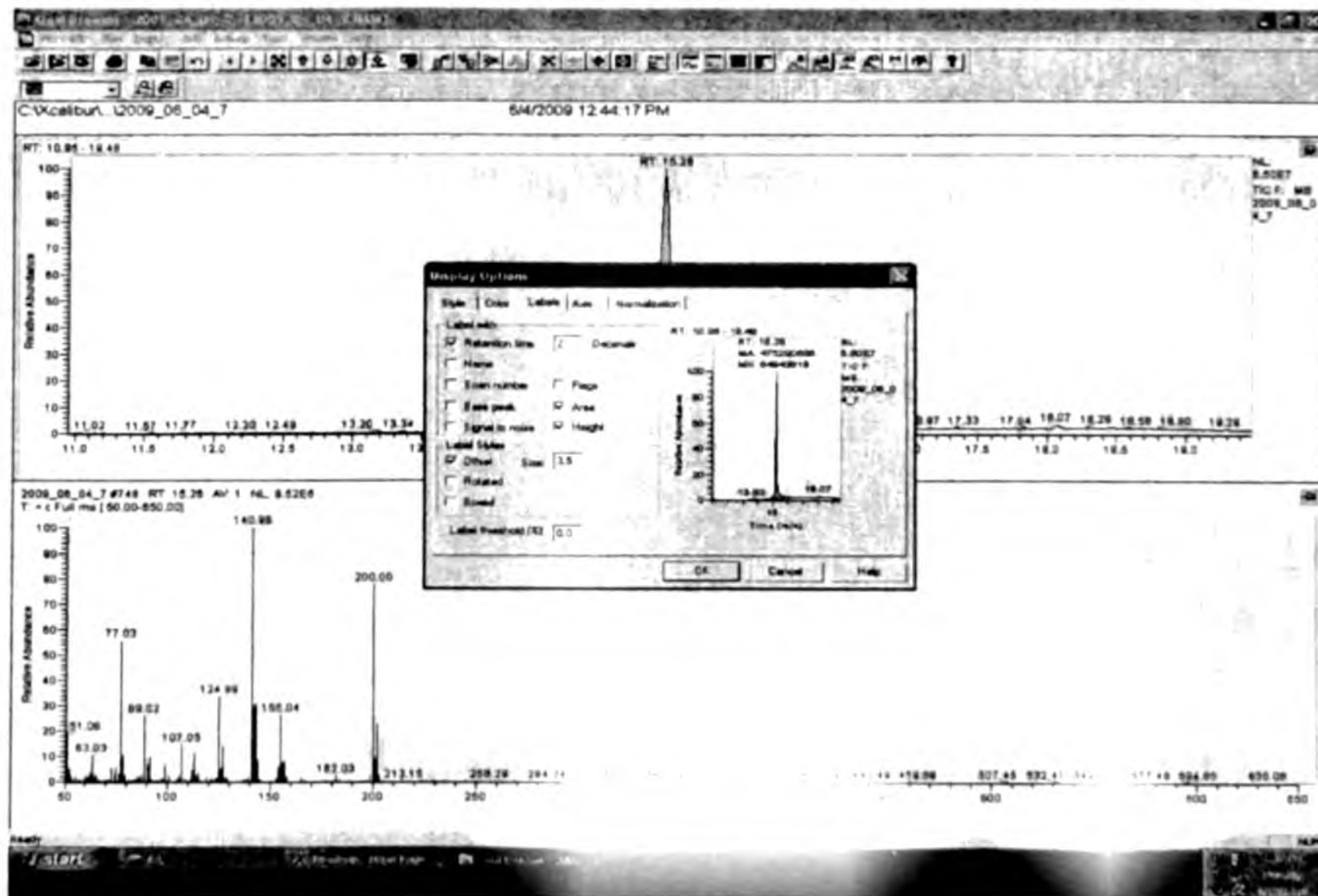


Рис. 10. Вычисление площади и высоты пика

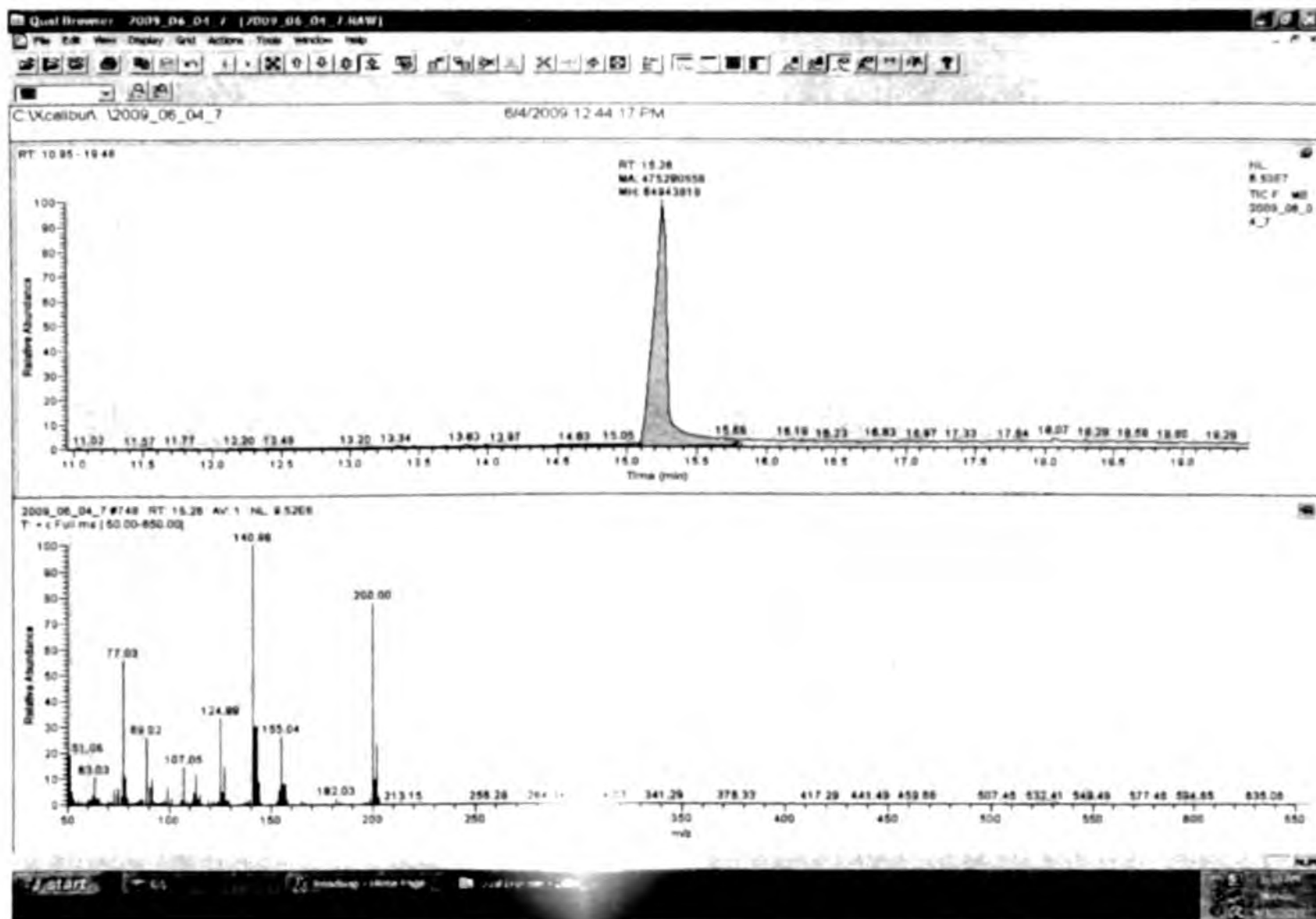


Рис. 11. Значения площади и высоты пика на хроматограмме

Отпечатано на участке оперативной полиграфии
редакционно-издательского отдела ТГУ

Заказ № 74 от « 8 » 06 2010 г. Тираж 50 экз.