

PRIMENA DISPERZIVNE MIKROEKSTRAKCIJE ČVRSTOM FAZOM KAO TEHNIKE PRIPREME UZORAKA ZA GC – MS ANALIZU PAU U VODI

Vesna P. Stankov Jovanović¹, Violeta D. Mitić¹, Marija D. Ilić¹, Snežana Č. Jovanović¹, Slobodan A. Ćirić¹, Gordana S. Stojanović¹

Izvod: Ciljevi istraživanja ovog rada su određivanje efikasnosti disperzivne mikroekstrakcije čvrstom fazom (D- μ -SPE) kao tehnike pripreme uzoraka vode za analizu 16 prioriternih PAU gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom, primenom novih sorbenasa. Tehnika pripreme uzoraka pokazala se kao veoma brza, efikasna i ekonomična. Rezultati predložene metode dokazuju da se ova tehnika može primeniti kao tehnika pripreme uzoraka za rutinsku analizu PAU u vodi. Prednosti ovakovog načina analize odlikuju se niskim vrednostima granice detekcije (od 0.147 ppb za benzo[a]antracen do 0.784 ppb za naftalen) i granice kvantifikacije (0.717 ppb za naftalen do 9.459 ppb za benzo[k]fluoranten).

Cljučne reči: D- μ -SPE, PAU, sorbens, GC – MS

Uvod

Policiklični aromatični ugljovodonici (PAU) predstavljaju organska jedinjenja koja sadrže dva ili više aromatičnih benzenovih prstenova sa molekulskom masom od 128 do 278. Postoji preko sto različitih PAU u životnoj sredini, među kojima je Američka agencija za zaštitu životne sredine njih 16 klasifikovala kao prioritne zagađujuće supstance: naftalen, acenaftilen, acenaften, fluoren, fenantren, antracen, fluoranten, piren, hrizen, benzo[a]antracen, benzo[b]fluoranten, benzo[k]fluoranten, benzo[a]piren, indeno[1,2,3-cd]piren, dibenzo[a,h]antracen, benzo[g,h,i]perilen. Zbog dugog perioda degradacije u životnoj sredini i toksičnog delovanja svrstavaju se u grupu dugotrajnih organskih zagađujućih supstanci. PAU pokazuju kancerogeno delovanje, dovode do akutne toksičnosti, razvojne i reproduktivne toksičnosti, citotoksičnosti i genotoksičnosti (WHO, 1998). Najčešće nastaju kao posledica nepotpunog sagorevanja organskih supstanci i njihovo poreklo u životnoj sredini je petrogeno, antropogeno i pirogeno (ASTDR, 1995). PAU su nepolarna, lipofilna jedinjenja koja lako isparavaju. Mogu se podeliti na PAU male molekulске mase (lake PAU) i PAU velike molekulске mase (teške PAU). Laki PAU se lakše rastvaraju u vodi, a rastvorljivost u vodi opada sa porastom molekulске mase.

Novi trendovi u analizi dugotrajnih organskih zagađivača, uključujući i PAU, ogledaju se u prevazilaženju nedostataka konvencionalnih ekstrakcionih pristupa i poštovanju pravila „zelene“ analitičke hemije, te se u tom smislu, mikroekstrakcije sve više koriste. Upotreba mikroekstrakcionih postupaka pri pripremi uzoraka za analizu ogleda se u smanjenom utrošku rastvarača za ekstrakciju i vremenu pripreme uzoraka, uz očuvanu efikasnost određivanja.

¹Univerzitet u Nišu, Prirodno – matematički fakultet, Višegradska 33, Niš, Srbija (sjvesna@pmf.ni.ac.rs)

Brza, jednostavna, relativno nova i veoma efikasna tehnika prečišćavanja, disperzivna ekstrakcija čvrstom fazom (d-SPE) predstavljena je od strane Anastasiades i saradnika 2003. Nešto kasnije, D- μ -SPE kao minijaturizovana modifikacija d-SPE počela se koristiti pri ekstrakciji i prečišćavanju uzoraka kod analize tetraciklina, organofosfatnih pesticida, policikličnih aromatičnih ugljovodonika, triazina i jona teških metala.

D- μ -SPE, kao novi tip ekstrakcije čvrstom fazom koristi se za prekoncentrovanje, prečišćavanje i ekstrakciju. Kod ove tehnike, čvrsti sorbens nalazi se u rastvoru uzorka. Može se dodati pre ili nakon dodavanja uzorka bez prethodnog kondicioniranja, tako da se postupak prekoncentracije, prečišćavanja ili ekstrakcije sastoji samo od mućkanja i centrifugiranja, što ovu metodu odlikuje brzinom, jednostavnošću, robustnošću, ekonomičnošću i sigurnošću. Sorbensi se od tečnog uzorka odvajaju centrifugiranjem. Analiti od interesa selektivno se zadržavaju na sorbensu i sa sorbensa se odgovarajućim rastvaračem desorbuju. Selekcija sorbensa se vrši prema količini uzorka, prirodi i očekivanoj koncentraciji analita kao i samih fizičko – hemijskih karakteristika sorbensa. Najčešće korišćeni sorbensi za analizu PAU u uzorcima iz životne sredine su silicijum dioksid i polimerni sorbensi (Rawa-Adkonis i Namiečnik, 2006).

Cilj ovog istraživanja bio je određivanje efikasnosti D- μ -SPE kao tehnike pripreme uzoraka vode za analizu 16 prioriternih PAU GC-MS metodom, gde se kao tehnika pripreme uzorka koristila D- μ -SPE sa primenom novih sorbenasa na bazi prirodnog zeolita - klinoptilolita.

Materijal i metode rada

U ovom radu korišćeni su heksan i acetonitril (HPLC čistoće), Sigma Aldrich, PAU miksa, ampula u acetonitrilu koja sadrži 1 ppm svakog od 16 prioriternih PAU, unutrašnji standardi (perilen d_{12} , fenantren d_{10} i acenaften d_{10}), i surogat standardi (2-hlorfenol-3,4,5,6-d4, 2,4,6-tribromofenol, 2-fluorobifenol), Supelco, Bellefonte, Pennsylvania.

Seriya standardnih rastvora pripremljena je razblaživanjem od 0 - 200 μ L odmeravanjem 0, 1.875, 3.75, 18.75, 37.5, 75, 112.5, 150 i 187.5 μ L rastvora PAU u acetonitrilu ukupne koncentracije 16 ppm i razblaživanjem do 200 μ L heksanom. U svaki standardni rastvor dodavano je po 100 μ L (koncentracije 30 ppm) unutrašnjeg pripremljenog u dihlormetanu i 100 μ L (koncentracije 30 ppm) surogat standard pripremljenog u acetonitrilu. Svi rastvori su pripemani u tri ponavljanja.

Dejonizovana voda sa verifikovanim odsustvom PAU je spajkovana standardnim rastvorom koji sadrži 16 PAU u tri koncentracije .05, 1.5 i 3 ppb. Slepe probe pripremljene su na isti način ali bez dodavanja PAU miksa.

Zeolitni materijal (veličine čestica 0,063 – 0,1 mm) koji sadrži preko 90 % klinoptilolitne materije, prvo se ispere dejonizovanom vodom, zatim se suši na temperaturi od 120 °C. Osušeni klinoptilolit (5g) tretira sa 500 mL rastvora 0,1 mol L⁻¹ HCl u vremenu od 30 minuta uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici i sobnoj temperaturi. Potom se sorbens cedi na vakuumu i ispira do negativne reakcije na hloride. Nakon ispiranja, sorbens se termički tretira 3 h na temperaturama 120 (MK1), 300 (MK2), 400 (MK3), 500 (MK4), 600 (MK5), i 700 °C (MK6).

Kao metoda za pripremu uzorka u ovom istraživanju primenjena je D- μ -SPE gde se kao ekstraktant koristio heksan a kao disperzer acetonitril u smeši sa vodom (1:4 v/v). Odmeravano je po 400 μ L vode spajkovane u tri različite koncentracije (0,5, 1,5 i 3 ppb) i surogat standarde ukupne koncentracije 0,75 ppb, i prebacivano u mikrotube koje su sadržale testirane sorbense (460 mg). Nakon mućkanja (1 min) i centrifugiranja u centrifugi sa 6000 rpm (5 min), uklonjena je voda i dodavano je 500 μ L ekstraktanta i 100 μ L disperzera. Nakon mućkanja (5 min) i centrifugiranja na 6000 rpm (15 min) ekstrakti (400 μ L) su prebacivani u vijale i dodavano je po 200 μ L unutrašnjeg standardnog rastvora za kvantifikaciju. Ekstrakti pripremljeni na ovakav način analizirani su GC - MS metodom.

Snimanje je vršeno na aparatu Triple Quadrupole GC/MS system – Agilent 7000 Series, pod sledećim radnim uslovima: noseći gas He, temperatura 75 °C prvih 3 minuta a zatim povećanje temperature od 6 °C / min do temperature od 300 °C 10 minuta , pritisak 15.44 psi, protok gasa 3 mL/min. Korišćena je kolona (5 % Fenil metil siloksan - HP-5MS (dimenzije kolone 30 m x 250 μ m x 0.25 μ m). Snimanje je vršeno u SCAN modu

Rezultati istraživanja i diskusija

U cilju validacije D- μ -SPE (gde su se kao novi sorbensi koristile hemijsko-termičke modifikacije klinoptilolita) praćene GC – MS analizom, praćeno je nekoliko parametara: linearnost i linearni opseg, tačnost, preciznost, granica detekcije i granica kvantifikacije. Analitički parametri prikazani su u Tabeli 2.

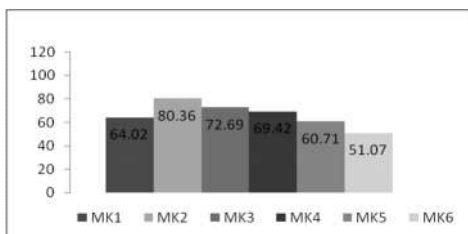
Tabela 1. Analitički parametri testirane metode: Retenciono vreme (RT), praćeni joni (m/z), korelacioni koeficijent (R^2), granica detekcije (LOD), granica kvantifikacije (LOQ), relativna standardna devijacija (RSD)

Table 1. Analytical parameters of the tested method: Retention time (RT), monitored ions (m/z), correlation coefficient (R^2), limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), relative standard deviation (RSD)

	RT (min)	Jon (m/z)	Jednačina prave	R^2	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	RSD (%)
Naftalen	11,23	128	$y=12,28*x$	0,982	0,784	0,717	1,006
Acenaftilen	16,99	152	$y=7,21*x$	0,980	0,377	0,888	0,970
Acenaften	17,7	152	$y=8,88*x$	0,989	0,508	1,014	1,029
Fluoren	19,63	165	$y=7,32*x$	0,984	0,372	0,998	0,986
Fenantren	23,21	178	$y=4,49*x$	0,999	0,409	2,114	1,000
Antraceni	23,23	178	$y=2,55*x$	0,980	0,383	3,485	0,173
Fluoranten	27,77	202	$y=1,19*x$	0,993	0,295	6,873	0,927
Piren	28,57	202	$y=2,06*x$	0,993	0,256	3,549	0,901
Krizen	33,24	228	$y=0,91*x$	0,998	0,235	8,571	1,083
Benzo[a]antraceni	33,38	228	$y=2,13*x$	0,987	0,147	2,298	0,632

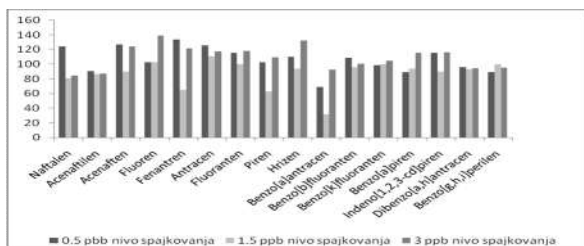
Benzo[b]fluoranten	37,14	252	$y=1,43*x$	0,984	0,207	5,396	1,588
Benzo[k]fluoranten	37,22	252	$y=0,74*x$	0,981	0,188	9,459	0,921
Benzo[a]piren	38,16	252	$y=5,95*x$	0,986	0,165	1,059	0,903
Indeno[1,2,3-cd]piren	41,65	276	$y=1,04*x$	0,999	0,197	7,869	1,333
Dibenzo[a,h]antracen	41,77	278	$y=1,28*x$	0,990	0,151	4,907	0,778
Benzo[g,h,i]perilen	42,46	276	$y=1,83*x$	0,999	0,160	3,718	1,106

Linearnost metode procenjena je preko korelacionog koeficijenta čije su sve vrednosti bile u opsegu od 0,980 do 0,999 za sve PAU, što je u dozvoljenim granicama (WDNS, 1994). Na osnovu jednačine prave, izračunate su koncentracije svakog PAU u model uzorcima vode, te vrednosti upoređene sa poznatim koncentracijama spajkovanih uzoraka i na taj način je određena tačnost metode izražena u procentima - efikasnost (Grafik 1 i 2)



Grafik. 1. Srednja vrednost efikasnosti za testirane sorbense
 Graphic.1. Mean value of recovery for tested sorbents

Sa grafički prikazane tačnosti uočava se da je hemijsko-termička modifikacija klinoptilolita MK2 (hemijski modifikovan klinoptilolit koji je žaren na temperaturi od 300 °C) dala najbolje rezultate efikasnosti (ekstrakcionog prinosa ili “recovery” vrednosti). Na sledećem grafiku prikazana je efikasnost za svaki od 16 prioriternih PAU.



Graf. 2. Tačnost metode izražena kao efikasnost (%) za modifikaciju MK2
 Graph.2. Accuracy of the method, expressed as a recovery (%) for MK2 modification

Vrednost efikasnosti za sva tri nivoa spajkovanja za sve PAU osim za fenantren (64.79 %), piren (62.44 %) i benzo[a]antracen (31.92 %), nalaze se u dozvoljenom opsegu od 70 – 120 % (Thompson i sar., 2002). Preciznost metode procenjena je preko relativne standardne devijacije, takođe poznate i kao koeficijent varijacije (C_v), modela uzoraka koji se analiziraju u više ponavljanja. Relativna standardna devijacija određena je analizom jednog uzorka istog dana jednim instrumentom pod istim uslovima (Stankov - Jovanovic i sar., 2017) i nalazila se u opsegu od 0,170 – 1,588 % za sve analizirane uzorke, što metodu odlikuje visokom preciznošću (Tabela 2).

Najniža koncentracija analita koja se može detektovati u uzorku, ali ne i kvantitativno odrediti, naziva se granicom detekcije (eng. Limit of Detection - LOD). Vrednosti granice detekcije predložene metode analize su u opsegu od 0.147 ppb za benzo[a]antracen do 0.784 ppb za naftalen.

Granica kvantifikacije se naziva i limitom kvantifikacije (eng. Limit of Quantification - LOQ) i definiše se kao najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću. Vrednosti granice kvantifikacije bile su u opsegu 0.717 ppb za naftalen do 9.459 ppb za benzo[k]fluoranten.

Zaključak

Novi sorbensi, hemijsko-termičke modifikacije klinoptilolita testirane su u analizi policikličnih aromatičnih ugljovodonika. Disperzivna mikroekstrakcija čvrstom fazom, kao tehnika pripreme uzoraka, pokazala se kao efikasna, ekonomična i brza tehnika pripreme uzorka. Među testiranim sorbensima, modifikacija klinoptilolita dobijena tretiranjem 0.1 mol L⁻¹ hlorovodoničnom kiselinom i žarenjem na 300 °C pokazala je najbolje rezultate u pogledu efikasnosti u analizi PAU gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom. Rezultati predložene metode dokazuju da se ova tehnika može primeniti kao tehnika pripreme uzoraka za rutinsku analizu PAU u vodi. Prednosti ovakvog načina analize odlikuju se niskim vrednostima granice detekcije i granice kvantifikacije.

Napomena

Ovo istraživanje sprovedeno je u okviru projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (evidencioni broj projekta: OI172047, OI172051)

Literatura

- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Polycyclic aromatic hydrocarbons.1995, US Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA. <http://www.atdsr.cdc.gov/toxpro.les/phs69>
- Barranco, R.M. Alonso-Salces, I. Crespo, L.A. Burreta, B. Gallo, F. Vicente, M. Sarobe. (2004) Polycyclic aromatic hydrocarbon content in commercial Spanish fatty foods. Journal of Food Protection. Volumen (67): 2786-2971.

- Barranco, R.M. Alonso-Salces, I. Crespo, L.A. Burreta, B. Gallo, F. Vicente, M. Sarobe. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbon content in commercial Spanish fatty foods", *Journal of Food Protection*. Volumen (67): 2786-2971.
- M. Rawa-Adkonis, L. Wolska, J. Namiećnik. (2006). Analytical Procedures for PAH and PCB Determination in Water Samples-Error Sources. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. Volumen (36:2): 63-72.
- Tang, U. Isacson. (2008). Analysis of mono- and polycyclic aromatic hydrocarbons using solid-phase micro extraction. *State of the Art, Energy Fuels*, Volumen (22): 1425 -1438.
- Thompson, M., S. L. Ellison, and R. Wood. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. Volumen (74:5):835-55. doi:10.1351/pac200274050835
- V. Stankov Jovanović, V. Mitić, S. Ćirić, M. Ilić, J. Nikolic, M. Dimitrijević i G. Stojanović.(2017). Optimized Ultrasonic Extraction for the Determination of Polyaromatic Hydrocarbons by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical Letters*.Volumen (50:15): 2491-2504. DOI: 10.1080/00032719.2017.1293677
- WDNS (Wisconsin Department of Natural Resources). "LOD/LOQ technical advisory committee report", 1994, WI LUST Analytical Guidance", PUBL-SW-130-93.
- WHO/IPCS (World Health Organization–International Programme on Chemical Safety). *Environmental Health Criteria 202*, 1998. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbon. Geneva.
www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm.

APPLICATION OF DISPERSIVE MICRO SOLID PHASE EXTRACTION AS A SAMPLE PREPARATION TECHNIQUE FOR GC – MS ANALYSIS OF PAHs IN WATER

*Vesna P. Stankov Jovanović¹, Violeta D. Mitić¹, Marija D. Ilić¹,
Snežana Č. Jovanović¹, Slobodan A. Ćirić¹, Gordana S. Stojanović¹*

Abstract: The aim of this paper is to determine the efficiency of D- μ -SPE with application of novel sorbents as a technique for sample preparation of water samples for the analysis of 16 priority PAHs by GC-MS. The sample preparation technique proved to be very fast, efficient and economical. The results of the proposed method demonstrate that this technique can be applied for routine analysis of PAHs in water. The advantages of this method are characterized by low values of limit of detection (from 0.147 ppb for benzo [a] anthracene to 0.784 ppb for naphthalene) and the limit of quantification (0.717 ppb for naphthalene to 9.459 ppb for benzo [k] fluorantene).

Key words: D- μ -SPE, PAHs, sorbents, GC – MS

¹ University of Nis, Faculty of Science and mathematics, Visegradska 33, Nis, Serbia (sjvesna@pmf.ni.ac.rs)